Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der
Universität Göttingen

Die Temperaturanpassung zweier Algenstämme und ihre Beeinflussung durch das Licht

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
CHINMOY RANJAN DAS, M. Sc. (Cal)
aus Kalkutta, Indien

Göttingen 1966

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544307_0023

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der
Universität Göttingen

Die Temperaturanpassung zweier Algenstämme und ihre Beeinflussung durch das Licht

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
CHINMOY RANJAN DAS, M. Sc. (Cal)
aus Kalkutta, Indien

Göttingen 1966

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

"-Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (D A A D)"

Referent: Professor Dr. A. Pirson

Koreferent: Professor Dr. A. Trebst

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 1966

Inhaltsübersicht Seite

I. Einleitung 2
II. Material und Methoden 4
1. Algenstämme 4
2. Anzuchtmethoden 5
3. Mess- und Bestimungsmethoden ... 7
III. Versuchsteil
1. Vorversuche 12
2. Photosynthese bei modifikativer Adaptation 14
3. Zellzusammensetzung nach modifikativer Anpassung 16
4. Reaktion der Algen auf Temperatursprünge 18
5. Teilungshemmung als kombinierte Wirkung von Temperatur und Licht 23
6. Wachstumsfaktoren und Temperaturgrenzen 30

Diskussion 35

Zusammenfassung 40

Literaturverzeichnis 43

I Einleitung

Wie alle Mikroorganismen sind die Algen in besonderem Maße befähigt, sich Veränderungen in ihrem Milieu anzupassen. Die Adaptation beruht hierbei entweder auf einer Selektion "spontaner" (gelegentlich auch induzierter) Mutanten oder auf einer Modifikation, d.h. einer nicht dem klassischen Genom unterworfenen Veränderung. Im ersten Fall ist der Erwerb der Anpassung in einer Population ein langfristiger, im Grundsatz irreversibler Vorgang, infolge der gegenüber Bakterien langen Generationsdauer der Algenzellen Wochen oder gar Monate beanspruchend (Beispiele bei Kellner (1956) und Kowallik (1962)). Im zweiten Fall dagegen tritt die Anpassung innerhalb weniger Zellgenerationen bzw. innerhalb von Tagen in Erscheinung und läßt sich durch entsprechende Gegenmaßnahmen leicht rückgängig machen. Diese letztere Art der Reaktion auf Außeneinflüsse, gelegentlich plasmatische Anpassung genannt, ist seit längerem besonders an der Leistung des Photosyntheseapparates untersucht worden, und zwar vor allem aus methodischen Gründen. Daß das "Vorleben" der Versuchsobjekte die photosynthetischen Fähigkeiten niederer und höherer Pflanzen stark beeinflussen kann, ist oft betont, wenn auch wohl nicht immer ausreichend berücksichtigt worden. Die einschlägige Literatur hat Simonis (1960) zusammenfassend dargestellt. Im Vordergrund steht hier unter den untersuchten Außenfaktoren die Belichtung, während andere Einflüsse während der Voranzucht mehr beiläufig oder unvollständig berücksichtigt worden sind. Es ist freilich von vornherein unwahrscheinlich, daß das Verhalten der Photosynthese als eines Sonderprozesses generelle Schlüsse auf die Anpassungsfähigkeit der Zelle, ihre Ursachen und

ihre Grenzen zu ziehen gestattet. Ein adaptives Verhalten der Photosynthese könnte sich sogar erst als Folge anderer Anpassungsvorgänge ergeben. Es ist daher erwünscht, Untersuchungen über modifikative Adaptationserscheinungen über die Photosynthese hinaus auf andere Bereiche des Zellgeschehens, z.B. Proteinsynthese, Nucleinsäurebildung und allgemeiner auf die zur Zellteilung führenden Vorgänge auszudehnen. In dieser Hinsicht ist bei Grünalgen noch wenig bekannt.

Die vorliegende Untersuchung stellt sich zunächst die Aufgabe, die modifikative Temperaturanpassung bei Algen des Chlorellatyps näher kennenzulernen. Nach dem Grundsatz der vergleichenden Physiologie wurde mit zwei Algenstämmen gearbeitet, deren Wachstum ihrer Herkunft entsprechend auf verschiedene Temperaturbereiche eingestellt ist. Denn es war von Interesse zu prüfen, ob und wie solche genetisch voneinander abweichenden "Temperaturtypen" sich in ihrer modifikativen Reaktion gegenüber dem Temperaturfaktor unterscheiden. Es war im übrigen zu beachten, daß die Wirkung der Temperatur auf das Algenwachstum nicht abgetrennt werden kann von gleichzeitigen Lichteinflüssen; denn wir wissen insbesondere seit den Befunden von Pirson u. Mitarbeitern (1962, 1964), daß die Chlorellazelle zumindest in bestimmten Entwicklungsstadien sensibel gegen Starklicht ist und daß eine solche Lichtempfindlichkeit in Richtung auf die Temperaturgrenzen des Wachstums recht kraß gesteigert sein kann (Lorenzen 1963, Sorokin u. Krauss 1965). Diese Interferenz von Temperatur und Licht wird im zweiten Teil der Arbeit eingehend berücksichtigt.

II. Material und Methoden

1. Algenstämme

a. Hochtemperatur-Stamm. Chlorella 211/8 k:

Dieser Stamm, isoliert und erstmals beschrieben von Sorokin (1959), ist physiologisch vor allem durch die hohe Wachstumsrate gekennzeichnet, die er bei 39°C erreicht. Ursprünglich unter der Bezeichnung Chlorella pyrenoidosa CHICK, strain 7-11-05 und später in den Sammlungen Cambridge bzw. Pringsheim unter der Stammnummer 211/8k geführt, wird er von Shihira und Krauss (1963) als neue Spezies Chlorella sorokiniana nov.spec. bezeichnet. Jedoch sind die einschlägigen taxonomischen Fragen noch umstritten und daher die umfangreichen Arbeiten zur Neuordnung der Gattung Chlorella noch keineswegs abgeschlossen (vgl. Kessler und Czygan (1966)); daher wird hier die Bezeichnung der Sammlung Pringsheim beibehalten.

b. Niedertemperatur-Stamm.

Dieser Stamm wurde von O.L. Lange (1962) am Stereocaulon alpinum LAUR., einer nachweislich an niedrige Temperaturen angepakten Flechte, isoliert. Die genetische Anpassung der Alge selbst, die zunächst zweifelhaft schien (Lange 1965), ist durch Versuche von Koch und Lange (unveröffentlicht) inzwischen sichergestellt. Sie ist nach ihren morphologischen Merkmalen von W. Koch (Algensammlung Pringsheim) als Pseudochlorella pyrenoidosa (Zeitler) LUND bestimmt worden (Lund 1955).

2. Anzuchtmethoden

a. Nährlösung

Zur Anzucht beider Algenstämme erwies sich die folgende Nährlösung als geeignet:

Hauptelemente	Mol/L	Mg/L
KNO_3	1×10^{-2}	1011.10
NaH_2PO_4, 1 H_2O	4.5×10^{-3}	621.00
Na_2HPO_4, 2 H_2O	0.5×10^{-3}	89.00
$MgSO_4$, 7 H_2O	1×10^{-3}	246.50
$CaCl_2$, 2 H_2O	1×10^{-4}	14.70
$FeSO_4$, 7 H_2O Fe-EDTA-Komplex§	2.5×10^{-5}	6.95
Spurenelemente		
H_3BO_3	1×10^{-6}	0.061
$MnSO_4$, 1 H_2O	1×10^{-6}	0.169
$ZnSO_4$, 7 H_2O	1×10^{-6}	0.287
$CuSO_4$, 5 H_2O	1×10^{-8}	0.00249
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 4 H_2O	1×10^{-8}	0.01235

§ Der Fe-EDTA-Komplex wurde folgendermaßen hergestellt: 0,70 g $FeSO_4 \times 7\ H_2O$ wurde in 0,093 g "Titriplex III" (Merck, Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure) in etwa 80 ml deppelt destillierten Wassers gelöst, kurz aufgekocht und nach Erkalten auf 100 ml aufgefüllt. 1 ml dieser Lösung enthielt die oben angegebene Eisensulfatmenge.

Alle Lösungen wurden mit reinsten Chemikalien der Firma Merck und mit 2 - 3fach (über Quarz) destilliertem Wasser angesetzt.

b. Anzuchtapparatur

Die Anzucht wurde in den bei Kuhl und Lorenzen (1964) eingehend beschriebenen Lichtthermostaten vorgenommen. Diese sind auf die jeweils gewünschte Anzuchttemperatur einstellbar. Während der Anzucht wurde von unten Luft begast, die CO_2 bis auf 1,5 - 2,0 Vol.-% angereichert enthielt. CO_2 war unter den gegebenen Bedingungen niemals wachstumsbegrenzender Faktor.

c. Kulturbedingungen

Die Kulturbedingungen waren dem Ziel der Arbeit entsprechend vielfach verschieden; dies gilt natürlich besonders für die Anzuchttemperatur. Soweit nicht anders angegeben, wurde bei 20.000 Lux angezogen (vgl.S.12).

Wie schon vielfach geprüft, sind Chlorellastämme in autotrophen Kulturen bei guten Entwicklungsbedingungen nahezu frei von Bakterien. Bei höheren Temperaturen oberhalb 30° könnte es jedoch zu einer stärkeren Bakterienentwicklung kommen, wenn nicht während der gesamten Anzuchtzeit eine Fremdinfektion vermieden würde. Da in einigen Fällen bakterielle Verunreinigungen zu falschen Schlüssen führen könnten (z.B. bei der Prüfung von Wirkungen der Vitamine), wurden solche Kulturen bei 30° und 35° in den bei Kuhl und Lorenzen (1964) beschriebenen Spezialkulturröhren zur bakterienfreien Anzucht durchgeführt. In allen Fällen wurden die Kulturen mit bakterienfreiem Material von Agarkulturen frisch angesetzt. Die Lösungen waren stets zuvor sterilisiert worden.

3. Mess- und Bestimmungsmethoden

a. Zellzählungen wurden in einer Zählkammer nach Thoma vorgenommen. Der im hiesigen Laboratorium benutzte Relativwert 100 entspricht $1{,}5 \cdot 10^6$ Zellen pro ml Algensuspension.

b. Das Trockengewicht der Algen wurde nach 2-3maligem Waschen mit destilliertem Wasser auf der Zentrifuge in vorpräparierten Aluminiumtiegeln (Kowallik) nach 4-stündigem Trocknen bei 105^o und anschließender Abkühlung im Exsikkator über $CaCl_2$ bestimmt.

c. Kohlenhydratbestimmung (Gesamtwert) nach Roe (1955) mit Anthron.

d. Gesamt-N und Protein nach der üblichen Methode im Mikrokjeldahl-Gerät (vgl.Ruppel 1962).

e. Nucleinsäuren

Zum qualitativen Nachweis der DNS diente die Feulgenmethode in der von Johansen (1940,S.95 f.) angegebenen Ausführung.

Quantitativ wurden RNS und DNS nach Ogur und Rosen bestimmt, und zwar in der von Ruppel (1962) angegebenen Modifikation.

f. Elektrochemische Sauerstoffbestimmung

Die hierzu benutzte und z.T. speziell ausgearbeitete Methode bedarf an dieser Stelle einer ausführlichen Schilderung.

Eine wesentliche Voraussetzung für die richtige Erfassung der apparenten Sauerstoffproduktion durch die Photosynthese in der wachsenden Algen-

kultur - ebenso wie des Sauerstoffverbrauchs bei der Dunkelatmung - ist die möglichst ungestörte Überführung der Algen aus der Anzuchtanlage in die Messapparatur. Diese Vorbedingung ist bei Anwendung der sonst oft bewährten manometrischen Methode nicht gegeben, da die manometrische Messung, sofern sie nicht durch Zusatzmaßnahmen und rechnerische Manipulationen kompliziert werden soll und dadurch anderen Fehlern ausgesetzt wird, meist eine drastische Veränderung im p_H-Wert des Mediums, wenn nicht sogar einen völligen Ersatz der Lösung und die Einstellung einer geeigneten Suspensionsdichte fordert. Es war daher eine Methode erwünscht, die bei der Messung der O_2-Produktion die Änderungen der Bedingungen bei Überführung ins Medium der Stoffwechselmessung soweit wie möglich einschränkt. Schön (1955) und Lorenzen (1959) haben versucht, dies durch polarographische Bestimmungen mit der Hg-Tropf-Elektrode zu erreichen. Obwohl dabei in der Messzeit keine stärkeren Störungen durch das Quecksilber beobachtet wurden, solange der Chloridgehalt auf minimalen Werten gehalten wurde, erschien es doch ratsam, den Kontakt von Lösung und Algen mit Quecksilber zu vermeiden. Die von Tödt u.Mitarb. (1958) entwickelte elektrochemische O_2-Bestimmung ("Bioflux"-Methode) schien daher im Prinzip vorteilhaft; doch bedurfte sie einiger Abwandlungen. Für die Atmungsbestimmung an Chlorella-Suspensionen hat sie bereits G.Wolf (Diss.1964) verwendet und darüber berichtet.

Mess-Anordnung: In die Lösung, deren O_2-Gehalt bestimmt werden soll, tauchen zwei Elektroden: eine Goldamalgam-Messkathode und eine Zink-Anode. Letztere enthält, durch ein Diaphragma von der Messlösung getrennt, als Füllung eine konzentrierte

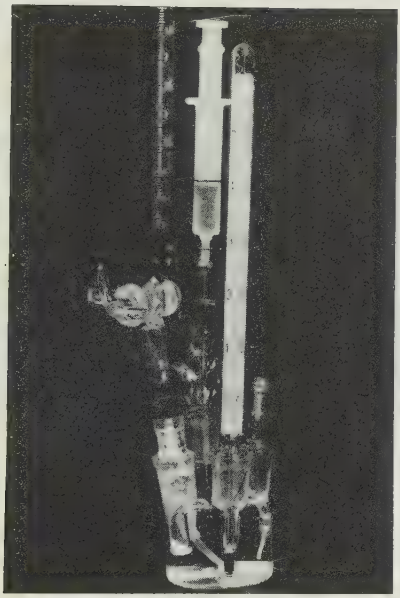

Abb. 1 Messgefäß der Tödt-Apparatur mit Zusätzen für die Eichung

KCl-Lösung. Die Verbindung der Elektroden kann über ein hochempfindliches Ampèremeter hergestellt werden. Die kathodische O_2-Reduktion $O_2 + 4 \quad +2H_2O = 4OH^-$ unterhält im geschlossenen Kreis einen der O_2-Konzentration proportionalen Stromfluß. Durch starke und andauernde Rührung (Magnetrührer mit 1000 Umdrehungen pro min) wird sichergestellt, daß die Diffusion des O_2 nicht begrenzender Faktor wird.

Die Elektroden-Anordnung im Bioflux-Gerät (Gefäßform siehe Abb. 1 und 2) wird von unten an einen Ultrathermostaten angeschlossen und der Überlauf so eingestellt (Schraubklemme), daß das Glasgefäß bei der Messung von Wasser konstanter Temperatur ganz umflossen wird. Die spezielle Montage für die Belichtungsversuche ist aus Abb.2 zu ersehen. Die Stromentnahme bei der Ablesung beschränkt sich jeweils auf 20 Sekunden. Drei innerhalb von 20 Minuten aufeinander folgende Messungen wurden in derselben Lösung durchgeführt. Die Linearität zwischen Ausschlag und O_2-Gehalt ist nach Angaben der Herstellerfirma bis zu Ausschlägen von 4 - 150 uA gegeben. Alle Messungen waren daher auf diesen Bereich beschränkt.

Es wurde ausdrücklich geprüft, ob bei der Messung Störungen durch die in der üblichen Nährlösung vorhandenen Ionen auftreten. Dies war nicht der Fall; selbst der ausgeprägteste Störfaktor Cu^{++} liegt, sofern vorhanden, in nicht mehr wirksamer Menge vor.

Selbstverständlich müßte sorgfältig darauf geachtet werden, daß keine Gasblasen im Messgefäß auftreten.

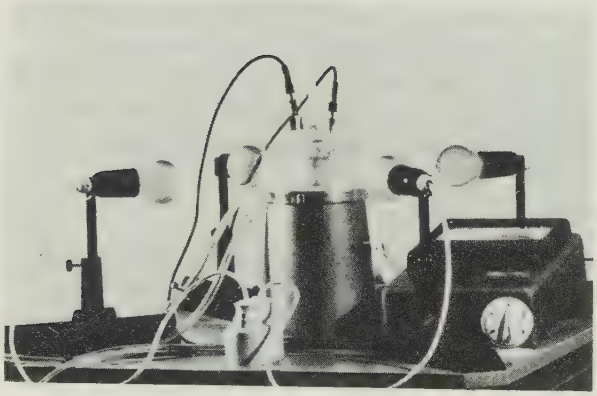

Abb. 2 Tödt-Apparatur mit Belichtungsanordnung

Die Photosynthesemessungen wurden unabhängig von der Art der Vorkultur stets bei einer Zellzahl von $1{,}6 \cdot 10^6$ Zellen/ml durchgeführt. Dazu wurde gegebenenfalls die aus der Kulturanlage entnommene Probe entsprechend mit Nährlösung verdünnt, gelegentlich auch konzentriert. Die Beleuchtungsstärke im Photosyntheseversuch wurde wie bei der Anzucht auf 20 KLux eingestellt (vgl.S. 12). Zur Photosynthesemessung wurden die vorbereiteten Proben im Dunkeln einige Zeit nochmals mit Stickstoff + 2 Vol.% CO_2 durchströmt, um optimale CO_2-Versorgung für die Dauer der Messungen sicherzustellen.

Eichung

Die Eichung der Gerätanzeige wurde folgendermaßen durchgeführt: Zwischen 5° und 35° wurde in Abständen von 5° eine Nährlösung mit Sauerstoff gesättigt. Von dieser Lösung wurde durch die in Abb.1 erkennbare Injektionsspritze jeweils 1 ccm in die auf gleiche Temperatur eingestellte Lösung im voll gefüllten Gefäß eingespritzt, nachdem diese zuvor durch Stickstoffbegasung sauerstofffrei gemacht war (was durch Ausbleiben eines Galvanometerausschlags sichergestellt wurde). Da das Messgefäß 50,5 ccm enthält, ging von den insgesamt 51,5 ccm 1 ccm verloren; der tatsächlich ins Gefäß gelangte O_2 entsprach dann dem Gehalt des zugegebenen 1 ml minus 1/51,5. Diese geringfügige Korrektur hatte keinen erheblichen Einfluß. Wegen der technischen Komplikationen, die beim Einbringen größerer Mengen (mehrere ml) O_2-gesättigter Lösungen entstanden wären, wurde die Eichung stets mit 1 ccm vorgenommen und verschiedene O_2-Gehalte auf Grund der Löslichkeiten bei verschiedenen Temperaturen

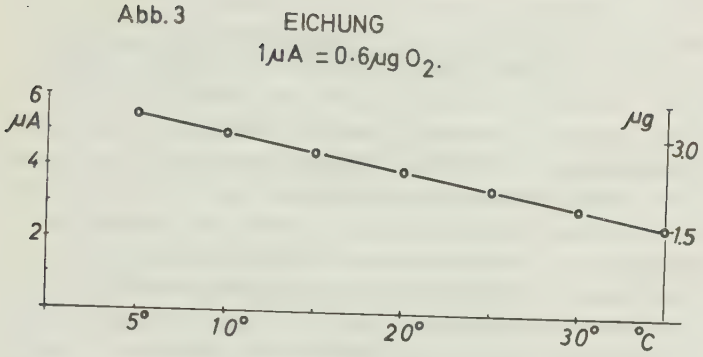

Abb.3 Eichung

eingestellt; dabei waren O_2-freie Lösungen im Messgefäß und die O_2-gesättigte Lösung stets gleich temperiert. Abb.3 gibt die Skalenausschläge in /uA, die auf diese Weise mit 1 ml O_2-gesättigter Lösung jeweils erhalten wurden, wieder. Die rechte Ordinate enthält die zugehörigen O_2-Werte in /ug, die nach der jodometrischen Methode von Winkler bestimmt worden waren. Die Ausschlagsänderung von +1 /uA zeigt demnach eine Zunahme um 0,6 /ug O_2 im Versuchsgefäß an. Dabei kann vorausgesetzt werden, daß die Anzeige des Geräts im untersuchten Bereich temperaturunabhängig erfolgt. Bei 5° und 35° treten zwischen Parallelmessungen größere Streuungen auf; bei diesen Temperaturen wurde jedoch nur selten gemessen. Das beschriebene Verfahren benutzt nur einen sehr kleinen Ausschnitt des Messbereichs des Geräts; doch kann mit Hilfe der Geraden ∠uA/∠ µ O_2 bis gegen 150 /uA Ausschlag interpoliert werden.

III. Versuchsteil

1. Vorversuche

a. Abhängigkeit der Photosynthese von der Beleuchtungsstärke

Die Abhängigkeit der Photosynthese von der Beleuchtungsstärke wurde an Suspensionen beider Algen nach Anzucht bei 25° und bei Beleuchtungsstärken von 17-20 KLux (Licht-Dunkel-Wechsel 12 : $\overline{12}$) gemessen. Die Messpunkte in der Kurvenschar der Abb.4 wurden jeweils mit Suspensionen getrennter Anzucht erhalten. Jeder Messpunkt ist das Mittel aus 3 aufeinander folgenden Bestimmungen von 20 Min.Dauer. Für beide Algenstämme wurde die Messung sowohl am Ende der 12-stündigen Lichtzeit als auch nach der 12-stündigen Dunkelzeit durchgeführt.

Als methodisch wichtiges Ergebnis zeigte sich, daß bei 20 KLux in allen Fällen der Maximalwert der photosynthetischen O_2-Produktion erreicht war. Daher konnten 20 KLux in allen folgenden Versuchen als Sättigungswert der Photosynthese angesehen werden. Höhere Beleuchtungsstärken bewirkten - vor allem bei Chlorella 211/8K - sogar eine leichte bis mäßige Leistungsdepression.

Während Chlorella 211/8K nach Abschluß der 12-stündigen Lichtzeit bei allen Beleuchtungsstärken erheblich höhere O_2-Werte lieferte als am Ende der Dunkelzeit, verhielt sich Pseudochlorella genau umgekehrt. Die Ursachen für diese auffällige Verschiedenheit dürften komplexer Natur sein. Bei 211/8K ist die endogene Atmung wesentlich geringer (weniger als die Hälfte) als bei Pseudochlorella (vgl.Abb. 4); bei Pseudochlorella ist die Atmung nach 12 Stunden Dunkelzeit deutlich höher als nach 12-stündiger Belichtung. Chlorella 211/8K verbraucht ihrerseits

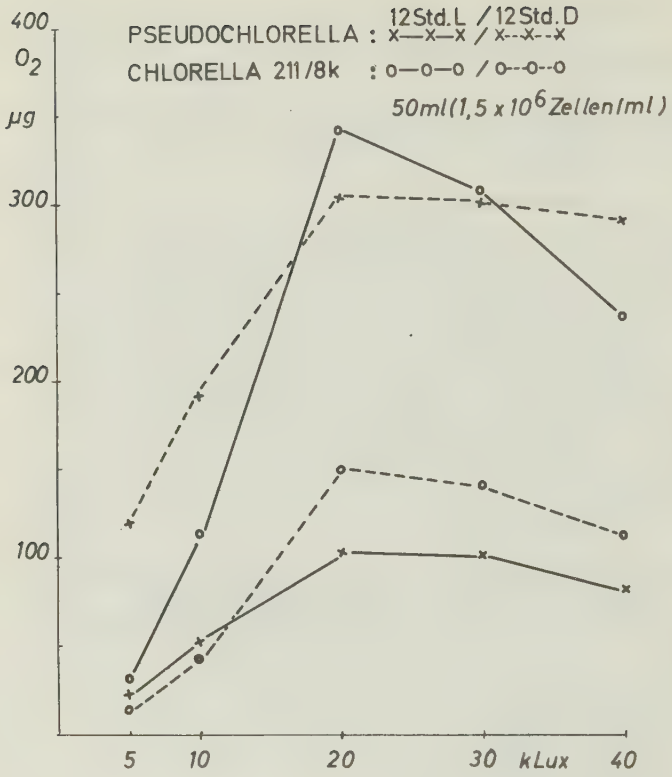

Abb.4 Abhängigkeit der apparenten Photosynthese von der Beleuchtungsstärke bei beiden Algenstämmen
Vorkultur: 17-20 KLux, 25°. LDW 12/12
Messtemperatur 25°
Messung jeweils nach Abschluß der Lichtzeiten und der Dunkelzeiten

nach der Dunkelzeit deutlich weniger O_2 im Dunkeln als direkt nach Belichtung. Sicherlich kann das Verhalten der Dunkelatmung nicht allein die Ausbildung der Differenzen im "Photosyntheseüberschuß" erklären. Die hier angeschnittenen Fragen verdienen eine eingehendere Prüfung, wobei vor allem der Synchronisationsgrad der Populationen, der unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei beiden Algenstämmen nicht der gleiche ist, zu berücksichtigen wäre.

b. Zellvermehrung und Beleuchtungsstärke

Die bei 25° vorkultivierten Arten wurden bei 25 und 15°C weiter untersucht, in diesem Falle ausgehend von je $0{,}8 \cdot 10^6$ Zellen/ml (= rel.Zellzahl 50). Unabhängig von Einzelunterschieden ergab sich auch hier, daß bei 20 KLux das Maximum der Zellvermehrung annähernd erreicht wurde. In den Kurven der Abb.5 ist bereits eine sehr ausgeprägte Differenz im Verhalten der Stämme nachzuweisen. In beiden Fällen zeigt der "Hochtemperaturstamm" einen drastischen Unterschied zwischen 25 und 15°; die niedrigere Temperatur (15°) verhindert ganz unabhängig von der Beleuchtungsstärke die Zellteilung nahezu vollständig. Dies besagt jedoch noch nicht, daß die Wachstumsvorgänge insgesamt stillgelegt wären. Dies auffällige Ergebnis steht in Einklang mit Beobachtungen von Sorokin und Krauss (1965) am gleichen Algenmaterial. Pseudochlorella dagegen zeigt nicht die großen Differenzen zwischen 25 und 15°; sie ist Chlorella 211/8K bei 15° mit deutlicher Zellvermehrung überlegen, vermag aber bei 25° die hier hohe Leistung von 211/8K bei weitem nicht zu erreichen. Diese Ergebnisse kennzeichnen bereits die genetischen Unterschiede beider Algen. Sie werden im folgenden Gegenstand ausführlicher Versuche und Überlegungen sein.

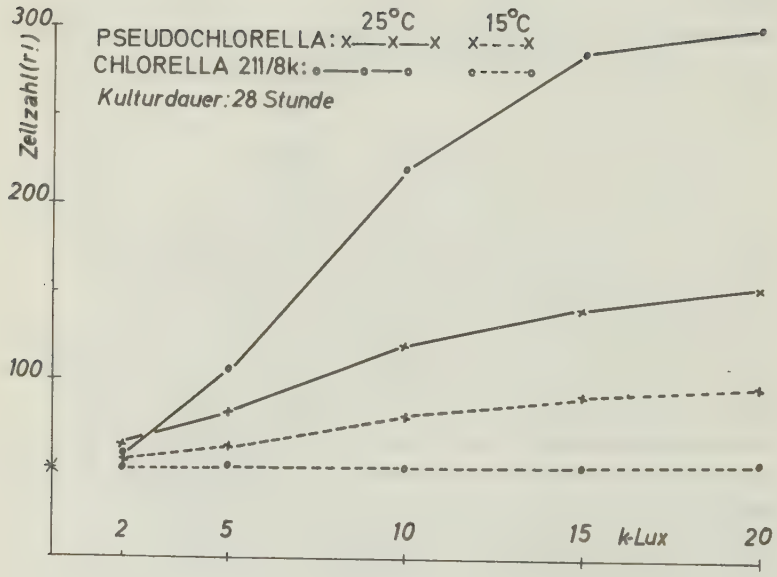

Abb. 5 Zellvermehrung beider Algenstämme im Bereich von 2-20 KLux
Ausgangsdichte 0.8 x 10^6 Zellen pro ml.

2. Photosynthese bei modifikativer Adaptation

Die beiden Algen wurden nunmehr mit 20 KLux bei 15, 25, 30 und 35°C vorkultiviert (soweit dies jeweils möglich war). Die Zeit der Vorkultur betrug 28 Stunden; eine Mutantenauslese kommt in dieser Zeit nicht in Betracht.

Jede dieser Kulturen wurde dann bei 10,(15),20, 30 und 35° im Tödt-Apparat bei 20 KLux auf die photosynthetische Leistungsfähigkeit geprüft. Die entsprechenden Kurvenscharen der Abb.6 und 7 stellen nach den zuvor gemachten Erfahrungen die Temperaturkurven der Maximalphotosynthese in der Abhängigkeit von Anzuchttemperatur dar. Die sehr verschiedene Reaktionsnorm beider Stämme kommt hier deutlich zum Ausdruck.

Pseudochlorella: Die 15°-Zellen liefern zwischen 10 und 20° Messtemperatur die höchstmöglichen Photosynthesewerte des Stammes; bei 30° ist die Photosynthese auf etwa ein Drittel des Höchstwerts herabgedrückt und bereits bei 35° ist keine positive Stoffbilanz mehr vorhanden. Dem entspricht auch, daß Pseudochlorella nicht direkt an 35° adaptiert werden kann (es sei denn, diese Anpassung erfolge auf Grund von Mutantenselektion). Bei 25° und bei 30° Vorkultur liegen die Photosynthesewerte merklich niedriger; jedoch ist hier bei 30 und 35° Messtemperatur eine Anpassung an die höheren Temperaturen nachzuweisen: 30°-Zellen sind bei 35° Messtemperatur immerhin noch zu etwa 50% ihrer Maximalleistung fähig. Während sich im Messbereich zwischen 20 und 35° die Photosynthesekurven der verschieden vorkultivierten Algen mehrfach überschneiden, bleibt das Maximum der Photosynthese in den 3 Kurven (15,25,30) bei der Temperatur von 20° festgelegt.

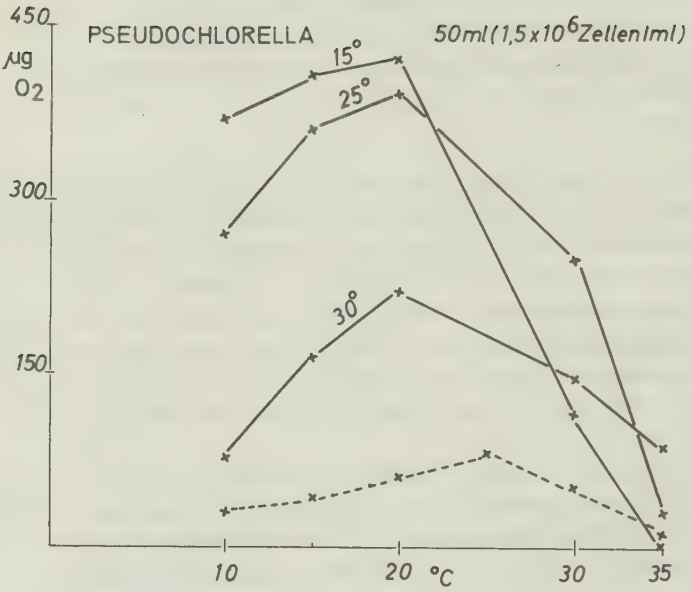

Abb. 6 Pseudochlorella
Abhängigkeit der Maximalphotosynthese (apparent) von der Temperatur in Beziehung zur Anzuchttemperatur, Beleuchtungsstärke 20 KLux
Anzuchttemperaturen 15, 25 und 30°
Zum Vergleich Anzucht auf Agar bei Zimmertemperatur (x- - -x- - -x)

In Abb.7 ist eine zusätzliche Photosynthese/Temperatur-Kurve für Zellmaterial aufgenommen, das bei Raumtemperatur auf Schrägagar angezogen und von dort direkt ins Tödt-Gefäß übertragen worden war. Diese Werte liegen weitaus am tiefsten von allen. Man kann daraus ersehen, daß neben der Anzuchttemperatur auch andere Faktoren, deren Einfluß auf dem Agarnährboden besonders hervortritt, ohne vorerst genauer bekannt zu sein, die Leistungsfähigkeit der photosynthetischen O_2-Produktion mitbestimmen. Die ungünstigen Folgewirkungen der Agaranzucht, in der auch die Wachstumsgeschwindigkeit zweifellos weit suboptimal ist, müssen daher durch Einschalten einer Flüssigkeitskultur beseitigt werden, bevor sich klarere Verhältnisse einstellen.

Chlorella 211/8K:

Der Parallelversuch mit dem sog.Hochtemperatur-Stamm liefert ein wesentlich anderes Bild, wie es die Übersicht von Abb.7 ergibt.

Hier ist zunächst zu erwähnen, daß entsprechend den früher (S. 13) gemachten Beobachtungen eine echte Vorkultur bei 15° nicht möglich ist. Die in 15° eingebrachten Zellen des Stammes wachsen zwar noch erheblich heran, teilen sich jedoch während der 28-stündigen Vorbehandlung nur zu einem ganz kleinen Anteil. Längeres Verbleiben bei 15° führt zu langsamem Absterben unter Ausbleichen (evtl.auch zur Selektion von stabilen Mutanten). Die mit 15° vorbehandelten Zellen sind also bei der Photosynthesemessung zum größten Teil noch die gleichen, die zuvor in diese Temperaturstufe eingebracht worden waren. Die apparente Photosynthese dieser Zellen ist bei allen Temperaturen sehr niedrig; sie steigt von 15° auf 25° leicht an und sinkt über 30 nach 35° fast auf den Nullwert ab. Hier wird infolge der

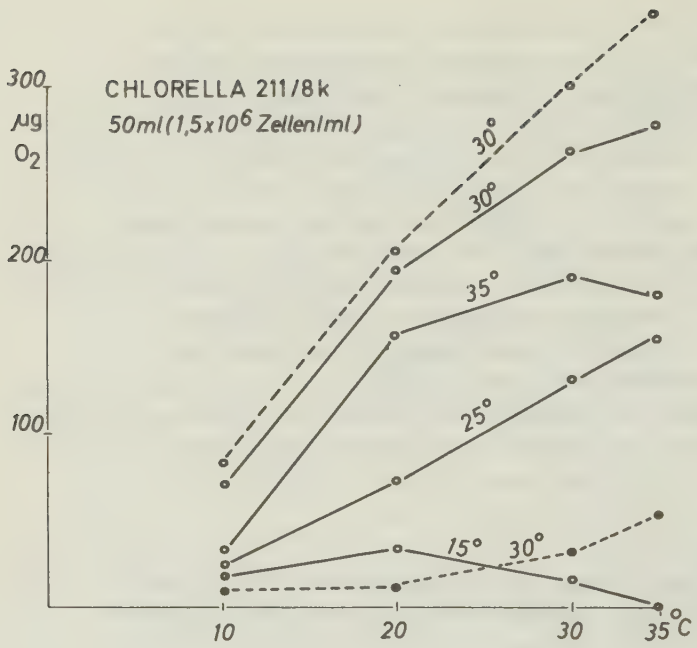

Abb.7 Chlorella 211/8K
Abhängigkeit der Maximalphotosynthese (apparent) von der Temperatur in Beziehung zur Anzuchttemperatur. Beleuchtungsstärke 20 KLux
Anzuchttemperaturen 15,25,30 und 35°
Die Dunkelatmung der 30°-Kultur ist (mit negativen Ordinatenwerten) mitaufgeführt, ebenso die errechnete absolute Photosynthese bei 30°
Atmung (●- - -●- - -●).Abs.Photosynthese(o- - -o)

Kältevorbehandlung die genetische Anpassung an höhere Temperaturen nicht mehr manifest.

Chlorella 211/8b zeigt die höchste Photosynthese bei 30° Vorkultur und 35° Versuchstemperatur. Bei 35°-Vorkultur ist die Photosynthese bereits leicht vermindert. Die 25°- Vorkultur liefert bei allgemein niedrigerer Photosynthese mit steigender Versuchstemperatur bis 35° gleichmäßig ansteigende O_2-Werte. Die Temperaturkurven der apparenten Photosynthese der beiden Kulturen bei 30 und 35° flachen dagegen nach den höheren Versuchstemperaturen zu stark ab. Dies ist zum Teil wohl auf ein kräftiges Ansteigen der endogenen Atmung bei 30° und 35° zurückzuführen. In Abb.7 ist unten die im Dunkeln gemessene Atmung der 30°-Vorkultur bei Temperaturen von 15° bis 35° mitaufgeführt, ebenso die mit diesen Werten kalkulierte absolute Photosynthese, wobei bekanntlich dies Verfahren keine ganz verbindlichen Werte liefert. Immerhin zeigt die mit der Atmung korrigierte Photosynthese der bei 30° vorkultivierten Algen einen ziemlich gleichmäßigen Anstieg bis hinauf zu 35° Versuchstemperatur.

3. Zellzusammensetzung nach modifikativer Anpassung

Zum Vergleich mit den Werten der Maximalphotosynthese (bei 20 KLux) wurden an den bei verschiedenen Temperaturen angezogenen Kulturen, wie sie im vorausgehenden Abschnitt beschrieben sind, nach der 28-stündigen Vorkultur Analysen einiger Hauptbestandteile ausgeführt. Die Daten sind in Abb.8 für beide Algenstämme wiedergegeben. Sie sollen dazu dienen, den physiologischen Zustand des Zellmaterials in Abhängigkeit von der Vorkultur (Adaptation) bei verschiedenen Temperaturen und damit auch den durch Adaptation

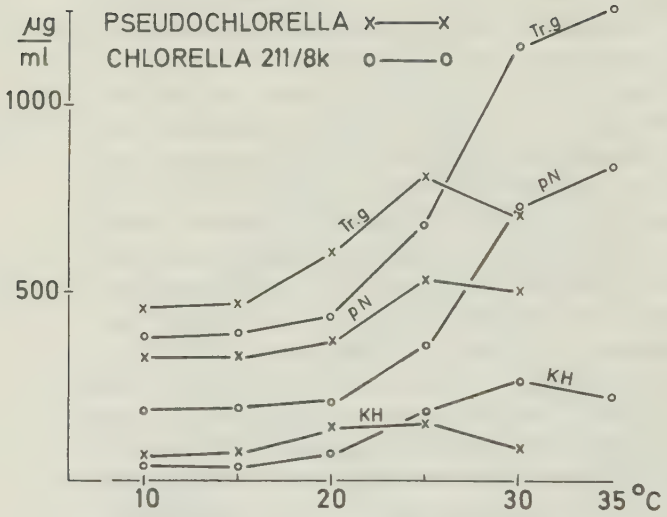

Abb.8 Analytische Daten für beide Algenstämme nach 28-stundiger Anpassung an verschiedene Temperaturen (10, 15, 20, 25, 30 und 35°).
Anzuchtbeleuchtung 17-20 KLux
Ausgangsdichte der Kulturen 1,5 x 10^6 Zellen/ml,
Trockengewicht (Tr.g), Kohlenhydrat (KH),
Protein (pN, errechnet aus Gesamtstickstoff x 6,25).

einstellbaren Temperaturbereich für beide Stämme genauer zu erfassen. Der Anschaulichkeit wegen sind die Werte für beide Algen in die gleichen Diagramme aufgenommen.

a. Trockengewichte: Die Produktion von Trockensubstanz (gemessen pro 10 ml) nimmt bei Chlorella 211/8K mit zunehmender Temperatur stark zu. Bei 10° und 15° ist kaum eine Trockengewichtszunahme feststellbar, bei 20° und 25°, wo unter den Versuchsbedingungen die Zellteilung nur gering ist, nimmt die Trockensubstanz beträchtlich zu. Der Hauptanstieg liegt zwischen 25° und 30°; die Werte bei 35° lassen ein leichtes Nachlassen der Produktionsleistung erkennen, obwohl bei diesem Stamm die Photosynthese bei 39° (oder sogar höher) ansteigen kann.

Pseudochlorella andererseits hat bei 10° und 15° eine mäßige Produktion, die dann über 20 und 25° zunimmt. Bis zu dieser Temperatur ist Pseudochlorella dem Stamm 211/8K überlegen. Bei 30° ist ihre Leistung aber bereits erheblich herabgesetzt und bei 35° ist eine Analyse nicht mehr sinnvoll, da die Zellen meist abgestorben sind.

b. Gesamt-Stickstoff und Kohlenhydrate: Dem Anstieg des Trockengewichts zwischen 20° und 30° entspricht die Zunahme von Kohlenhydrat und Stickstoff (des besseren Absolutvergleichs wegen auf Proteinwerte umgerechnet); bei letzterem ist der Anstieg zwischen 25 und 30° relativ und absolut,am steilsten, was die optimale Vermehrung plasmatischer Substanz (gegenüber der Speicherung) anzeigt. Von 30° nach 35° ist die N-Zunahme gering, die Kohlenhydrate nehmen sogar ab, was vor allem der starken Atmung zuzuschreiben sein dürfte. Pseudochlorella verhält sich hier insofern etwas anders, als die N- und

Kohlenhydratwerte beide ziemlich genau der Trockengewichtszunahme folgen. Dies spricht dafür, daß in dem für diesen Stamm geeigneten Wachstumsbereich eine relativ gleichmäßige Synthese des Zellmaterials stattfindet, d.h. die Produktion nicht in eine Speicherung ausweicht.

4. Reaktion der Algen auf Temperatursprünge

Im folgenden wird versucht, auf Grund der Reaktion auf größere Temperatursprünge weitere physiologische Kennzeichen für die beiden verschiedenen Stämme beizubringen. Dabei waren bei der Vorkultur jeweils Spezialbedingungen herzustellen, die nachfolgend genauer erläutert werden.

a. Übergang zu niedrigen Temperaturen

Chlorella 211/8K. Um Chlorella 211/8K bei der für sie niedrigen Temperatur von 15° überhaupt zu einer Reaktion zu veranlassen, darf sie nicht bei der ihr günstigen Temperatur von 30 oder 35° vorkultiviert sein. In diesem Fall wäre mit einem völligen Stillstand des Stoffwechsels oder gar mit einem Absterben zu rechnen, sofern 20 KLux geboten werden. Die Kultur wurde daher bei 25° im Licht-Dunkel-Wechsel vorgenommen. Dabei ergab sich eine Synchronisation. Die Autosporen aus einer solchen Kultur wurden zunächst 6 Stunden lang wiederum bei 25° belichtet und im Anschluß daran bei fortdauernder Belichtung (20 KLux) im Lichtthermostaten auf 15° gebracht.

Wie Abb.9 zeigt, trat in der Versuchszeit (30 Stunden) keine Zellteilung und nur eine sehr geringe Zunahme des Trockengewichts ein. Kräftig wurde dagegen die RNS vermehrt. Die DNS blieb ihrerseits praktisch unverändert. Der Zunahme der RNS entspricht annähernd ein Anstieg im Gesamtprotein, der bei der sehr gerin-

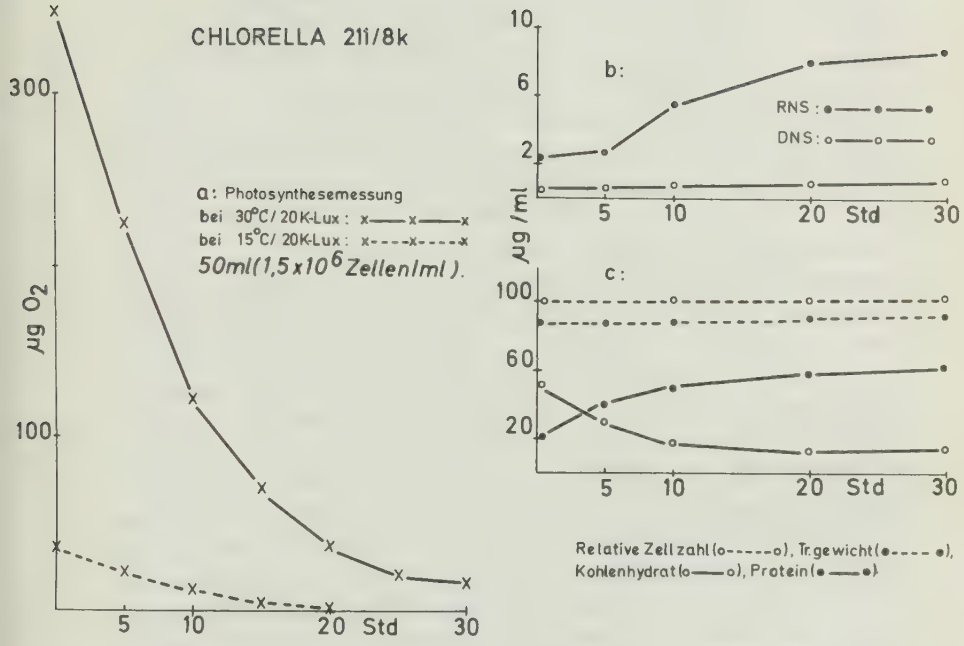

Abb.9 Chlorella 211/8K,
Übergang zu niedriger Temperatur (15°).
Vorbehandlung 25°, LDW 12:12, danach 6 Stunden Licht.
a: Photosynthese
b: RNS, DNS
c: Zellzahl, Trockengewicht, Kohlenhydrat, Protein

gen Zunahme des Trockengewichts weitgehend auf Kosten der Gesamtkohlenhydrate erfolgt.

Die Trockengewichtsdaten schließen bereits eine positive Stoffbilanz bei 15° aus. Direkte Messungen der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung in Stichproben (1 Stunde Messzeit) nach verschieden langem Verweilen in 15° (Dauerlicht) - parallel zu den Bestimmungen der Zellsubstanzen (Abschnitt III,3) - bestätigen dies; die Photosynthese, die schon bei unmittelbarer Übertragung von 25° in 15° nur etwa 1/10 des entsprechenden Wertes bei 30° liefert (vgl. Anfangswerte im Photosynthese-Diagramm der Abb.9), sinkt mit zunehmender Einwirkungsdauer der niedrigen Temperatur weiter ab. Nach 20 Stunden ist der Nullwert (Gaswechselgleichgewicht) nahezu erreicht. Parallel zu den O_2-Messungen bei 15°wurden an den kältebehandelten Proben auch entsprechende O_2-Bestimmungen bei 30° vorgenommen, um zu prüfen, wieweit sich die Behandlung mit der niedrigen Temperatur auf die Maximalleistung der Photosynthese auswirkt. Auch bei der hohen Messtemperatur erfolgt ein steiler Leistungsabfall. 10 Stunden Verweilen in 15° setzt die Leistung bei 30° auf mehr als die Hälfte, 30 Stunden Behandlungszeit schließlich auf etwa 1/15 herab. Die Wirkung der Kälte kann somit, wenigstens bezüglich der Photosynthese, nicht kurzfristig aufgehoben werden, sondern ist nachhaltigerer Natur.

Für einen Vergleichsversuch mit Pseudochlorella wurden die Bedingungen festgelegt, die bei diesem von Natur aus an niedrige Temperatur angepaßten Stamm zur entsprechenden Wachstumshemmung führten. Ein gutes Wachstum bei höchstmöglicher Temperatur wurde zunächst dadurch erzielt, daß im Dauerlicht ein Wechsel der Temperatur von 12 Stunden 20° mit 12 Stunden 30° verabfolgt wurde (72 Stunden lang). Eine Synchronisation

trat hierbei nicht ein. Es folgte dann im Licht (nach 12 Stunden bei 30°) ein Temperatursprung von 30 auf 10°; bei 10° wurden die Kulturen weiteruntersucht, entsprechend dem Versuch mit Chlorella 211/8K bei 15°. Für Pseudochlorella ist bei 15° noch keine Teilungshemmung gegeben. Es ist bemerkenswert, daß in der unteren Grenze der Teilungsfähigkeit nach Temperatursprüngen zwischen den beiden Stämmen nur eine Differenz von 5° besteht, während in Richtung auf die hohen Temperaturen die Unterschiede allgemein ausgeprägter erscheinen.

Die Diagramme der Abb.10 zeigen für Pseudochlorella bei dem durch die Temperatursenkung auf 10° bedingten Teilungsstop im Grundsatz das gleiche Verhalten der Messgrößen, wie es schon bei Chlorella 211/8K beschrieben wurde: bei annähernd konstanter Zellzahl und kaum vermehrtem Trockengewicht nehmen Protein und RNS beträchtlich zu, während das Kohlenhydrat bei stark gehemmter oder sistierter apparenter Photosynthese auf etwa 1/6 seines Ausgangswertes absinkt. Die durch die Kältebehandlung herbeigeführte Photosynthesehemmung erwies sich auch in diesem Falle als nachhaltig, d.h. sie war nicht durch Rückführung in die höhere Ausgangstemperatur zu beheben.

Es sei hier vermerkt, daß die bei niedriger Temperatur teilungsgehemmten Zellen beider Stämme ihr Volumen in der Versuchszeit vergrößerten, obwohl dies auf Grund der Trockengewichtsdaten allein nicht zu erwarten gewesen wäre. Eine solche Volumenvergrößerung ohne Substanzzunahme ist als auffälliger Effekt schon von Johnson und James (1960) an Chilomonas paramaecium beschrieben und mit einer Wasseraufnahme in Zusammenhang gebracht worden, deren Mechanismus allerdings nicht geklärt werden konnte. Interessant ist jedenfalls, daß die Volumenvergrößerung der Zellen offensichtlich nicht als obligatorische Folge einer Nettovermehrung der Zellsubstanz zu betrachten

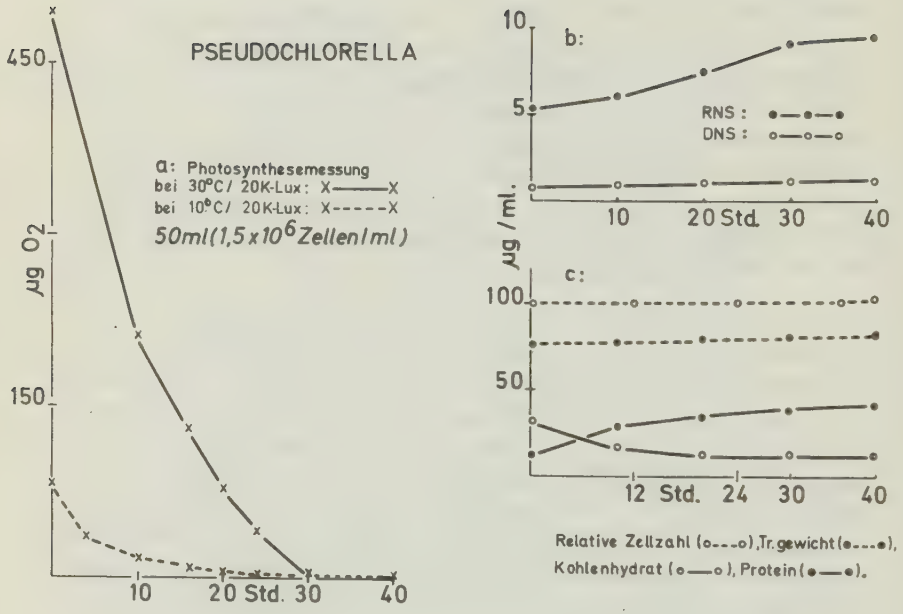

Abb.10 Pseudochlorella,
Übergang zu niedriger Temperatur (10°).
Vorbehandlung: Dauerlicht, Temperaturwechsel.
(12:12) 20°/30° (72 Stunden), dann 30° für
6 Stunden.
a: Photosynthese
b: RNS, DNS
c: Zellzahl, Trockengewicht, Kohlenhydrat,
Protein

ist. Sofern es sich um eine aktive Wasseraufnahme handelt, wäre der beschriebene Effekt mit einer unterschiedlichen Temperaturabhängigkeit von Wasseraufnahme und Zellsynthesen erklärbar.

b. Übergang von niedrigen zu hohen Temperaturen

Pseudochlorella

Bei diesem Algenstamm, der genetisch an niedrigere Temperaturen angepaßt ist, ergeben sich die deutlichsten Hemmeffekte im Übergang zu höheren Temperaturen, während der "Hochtemperaturstamm" 211/8K sich nach den im vorigen Abschnitt mitgeteilten Befunden vornehmlich zur Demonstration der entsprechenden Hemmeffekte bei niedrigeren Temperaturen eignet.

Die Versuche, deren Ergebnis in Abb.11 zusammengefaßt ist, zeigen zunächst an den Zellzahlen, daß die Vermehrung der Algen, die bei Raumtemperaturen (18-22°) auf Agar vorkultiviert waren, ihr Optimum bei 25° hat. Bei dieser Temperatur unterscheidet sich Pseudochlorella im Verhalten nicht wesentlich von anderen gängigen Chlorellastämmen. Dagegen ist hier die Vermehrung nach Überführung in 30° bereits stark herabgesetzt. Bei 15° ist die Teilung bei der gegebenen Vorbehandlung gering und bei 10° sogar sistiert; doch besagt dies nicht, daß nicht bei längerem Aufenthalt in 15° und 10° (und bei anderen Beleuchtungsbedingungen!) doch eine ergiebigere Vermehrung eintreten könnte.

Während die an der unteren Temperaturgrenze teilungsgehemmten Zellen bei anhaltender Vermehrung der RNS zu keiner DNS Vermehrung befähigt sind, liegen an der oberen Temperaturgrenze (30°) von Pseudochlorella andere Verhältnisse vor. Im Vergleich zum Optimalbereich um 25°, wo RNS und DNS ungefähr koordiniert zunehmen,

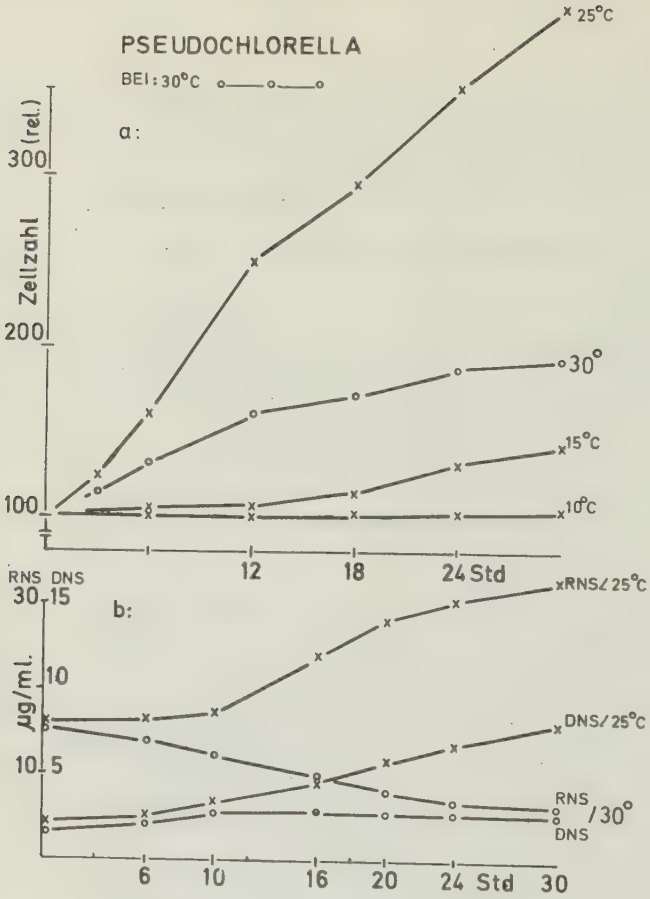

Abb.11 Pseudochlorella

Übergang zu höherer Temperatur (30°).
Vorbehandlung: Agarkulturen (18-22°),
natürliche Beleuchtung.

a: Zellvermehrung im Dauerlicht nach Übergang zu 30°. Zum Vergleich sind die Daten für die Versuchstemperaturen 25,15 und 10° mitaufgeführt

b: RNS und DNS bei Übergang zu 30° (o——o——o). Zum Vergleich sind die entsprechenden Daten einer Kultur bei 25° Versuchstemperatur mitaufgeführt (x——x——x).

ist bei 30° noch eine leichte DNS-Zunahme nachzuweisen, wogegen die RNS im Laufe der Versuchszeit von 30° etwa auf die Hälfte ihres Ausgangswertes abnimmt. Dies spricht für eine durch die supraoptimale Temperatur ausgelöste Abbautendenz im Plasma. Die Zellen der 30°-Serie sind dennoch zum größten Teil übernormal herangewachsen und die Feulgen-Reaktion läßt nach der Versuchszeit oft mehrere Farbzentren pro Zelle erkennen; diese müssen vollwertigen Kernen entsprechen, da nach Herstellung normaler Bedingungen solche vielkernige Zellen verschwinden, d.h. ihre Zellteilungen nachholen können. An der oberen Temperaturgrenze folgt also der schwachen DNS-Zunahme oft noch eine Mitose ohne Zellteilung, was an der unteren Temperaturgrenze kaum beobachtet wurde. Die Hemmung betrifft hier also nicht nur die DNS-Produktion und Mitose, sondern auch andere Vorgänge, die mit der Plasmateilung verbunden sind.

Chlorella 211/8K.

Aus technischen Gründen ist die Erfassung der oberen Temperaturgrenze und die physiologische Kennzeichnung der Zellen bei Chlorella 211/8K schwierig. Obwohl sich dieser Stamm unter den üblichen Laboratoriumsbedingungen (Licht-Dunkel-Wechsel und höhere Suspensionsdichten) bei 39° optimal vermehrt, ist es immerhin möglich, auch hier schon bei 35° einen Teilungsstop zu erzielen. Hierzu verwendeten wir Zellmaterial (Autosporen) einer in 12:12-Stunden synchronisierten Kultur, die noch 6 Stunden bei 25° belichtet und dann bei 35° ins Dauerlicht gebracht waren. Nach längerer Zeit (50 Stunden) ähnelten diese Zellen denjenigen von Pseudochlorella bei 30°. Sie waren stark herangewachsen und zeigten bei der Feulgen-Reaktion mehrere Kerne. Analysen wurden an diesem Material nicht durchgeführt.

5. Die Teilungshemmung als kombinierte Wirkung von Temperatur und Licht

Nach den vorliegenden Erfahrungen werden die Grenzen der Entwicklungsmöglichkeit von Einzellern nicht durch eine gleichmäßige Sistierung des Gesamtstoffwechsels, sondern durch die Blockierung einzelner wichtiger Vorgänge, besonders im Teilungsmechanismus, bestimmt. So erscheint in unserem Fall besonders die untere Temperaturgrenze beider Stämme offensichtlich durch eine selektive Empfindlichkeit der DNS-Produktion festgelegt. Es kommt nun die Frage hinzu, ob eine solche Begrenzung ausschließlich durch die Temperaturverhältnisse bestimmt ist. Für Chlorellen ist nämlich bereits bekannt, daß eine bei höherer und niederer Temperatur auftretende Teilungshemmung gleichzeitig von der Belichtung abhängt; sie kann durch Verdunkeln aufgehoben oder verringert werden (Lorenzen 1963, Sorokin und Krauss 1965). Aus diesem Grunde wird an den Temperaturgrenzen der Zellvermehrung der Licht-Dunkel-Wechsel unter Umständen zur obligatorischen Kulturbedingung, während im Bereich mittlerer Temperaturen ohne weiteres auch Dauerlicht geboten werden kann. Nach Pirson und Ruppel (1962) ist eine solche Wachstumshemmung vornehmlich in älteren Zellen nachzuweisen, bei denen jedoch die DNS-Synthese noch im Gange ist (Lorenzen und Ruppel 1960).

Um den Einfluß des Lichtfaktors auf die Temperaturhemmung auch bei unseren Stämmen zu prüfen, wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, in denen nach bereits eingetretener Teilungshemmung verdunkelt wurde; neben Zellzählungen wurde gleichzeitig der Gesamtstickstoff, die DNS und die RNS bestimmt. Die Ergebnisse sind im folgenden in Form von Tabellen wiedergegeben. Diese fassen die Versuche zusammen, in denen Pseudochlorella bei relativ hoher Temperatur (30°) und Chlorella 211/8K bei relativ niedriger Temperatur (15°)

zur Teilungshemmung gebracht worden waren.

T a b e l l e 1

Pseudochlorella bei 30°. Versuch nach 6 Stunden Lichtzeit anschließend an LDW 12/12 (25°). Direkt verdunkelt (30°). Kontrolle im Dauerlicht bei 30° in Klammern angeführt:

Versuchszeit nach Temperaturwechsel (fortlaufend)	Licht regime	Zellzahl (rel.)	Gesamt-N (γug/ml)	Nucleinsäuren (γug/2 ml) DNS	RNS
00 Stunde	00 Dunkel	75(75)	12(12)	.43(.43)	5.6(5.6)
02 -	02 -	90(75)	14(12)	.45(.42)	5.7(5.5)
04 -	04 -	95	15	.48	5.8
08 -	08 -	100	15	.52	5.85
12 -	12 -	105(80)	15(13)	.57(.40)	5.9(5.5)
17 -	05 Licht	105(80)	17(13)	.57(.36)	7.5(5.2)
24 -	12 -	105(80)	18(14)	.57(.34)	10.2(4.8)

T a b e l l e 2

Pseudochlorella bei 30°. Versuch nach 6 Stunden Lichtzeit anschließend an 12/12 LDW (25°). 10 Stunden Belichtung bei 30°, danach Verdunklung bei 30°. Kontrolle im Dauerlicht bei 30° in Klammern:

10 -	00 Dunkel	40(40)	10(10)	.24(.24)	4.5(4.5)
14 -	04 -	50	11.5	.30	4.2
19 -	09 -	55	12.6	.36	3.9
22 -	12 -	55(45)	13(11)	.38(.22)	3.9(4.0)
34 -	12 Licht	58(45)	13(11)	.42(.20)	6.8(3.8)
46 -	12 Dunkel	80(48)	14(11)	.54(.20)	7.0(3.4)

Pseudochlorella

Nach Behandlung mit LDW 12:12 und anschließender 6stündiger Lichtzeit (25°) wurden die in diesem Falle kaum synchronisierten Populationen a) in Dauerlicht und 30° (Kontrolle) verbracht und b) für 12 Stunden verdunkelt und dabei zugleich in 30° überführt. Pseudochlorella teilt sich dann in nicht adaptiertem Zustand im Dauerlicht nicht, in der Dunkelheit jedoch mit etwa 35% Zellvermehrung. Wiederbelichtung (12 Std.) sistiert erneut die Vermehrung. Der Gesamtstickstoff der Zellen wird im Dauerlicht etwas vermindert (Abbau?), im LDW um etwa 25% vermehrt. Die DNS, im Dauerlicht fast konstant, nimmt im LDW der Zellvermehrung proportional zu. Die stärkste Vermehrung im LDW zeigt die RNS, die andererseits im Dauerlicht ebenso wie der Gesamtstickstoff leicht vermindert wird (Tabelle 1).

Im anderen Versuch (Tabelle 2) wurde die Verdunklung erst vorgenommen, nachdem die Zellen bereits 10 Stunden bei 30° belichtet worden waren. Die Teilung im LDW war hier etwa 4mal so stark wie im Dauerlicht, wobei wiederum Zellvermehrung und DNS-Bildung in der gleichen Grössenordnung liegen. Die Vermehrung des Gesamt-N ist mit etwa 30% wiederum wesentlich geringer als der markante Anstieg der RNS im LDW (wieder gegenüber einer leichten Abnahme im Dauerlicht). Bemerkenswert ist die leichte Vermehrung der Zellzahl bei Verringerung des DNS-Gehalts in der Dauerlichtkontrolle. Dieser Effekt ist schwer zu deuten. Grundsätzlich ist ein solches Verhalten möglich, wenn die Kerne einen höheren Grad von Polyploidie oder Polytänie besitzen (vgl. Mazia 1961, S.114 f.; Jwamura 1955). Es sei hierzu bemerkt, daß in diesem und in anderen Vergleichsversuchen die teilungsgehemmten Zellen oft vielkernig waren (vgl. S.33).

In dem dritten hier aufgeführten Versuch mit Pseudochlorella (Tabelle 3) wurde die hohe Temperatur mit

Belichtung 20 Stunden lang appliziert, bevor die Verdunklung einsetzte. Bei völlig gehemmter Teilung und leichter Abnahme von DNS und RNS in der Dauerlichtkontrolle ergab der LDW eine mäßige Zellvermehrung, wiederum mit dem entsprechenden Anstieg der DNS und auch der kräftigen Zunahme der RNS.

T a b e l l e 3

Pseudochlorella bei 30°. Versuch nach 6 Stunden Lichtzeit anschließend an 12/12 LDW bei 25°. 20 Stunden Belichtung bei 30°, danach Verdunklung bei 30°. Kontrolle im Dauerlicht bei 30° in Klammern:

Versuchszeit nach Temperaturwechsel (fortlaufend)	Lichtregime	Zellzahl (rel.)	Gesamt-N (γug/ml)	Nucleinsäuren (γug/2 ml) DNS	RNS
20 Stunden	00 Dunkel	100(100)	15(15)	.52(.52)	5.6(5.6)
28 -	08 -	110	17	.54	5.4
32 -	12 -	115(100)	18(15)	.56(.50)	5.2(5.3)
44 -	12 Licht	116(100)	19(15)	.58(.48)	12.6(5.2)
56 -	12 Dunkel	125(102)	20(16)	.66(.45)	9.9(5.0)

Chlorella 211/8K

Zunächst wurden Agarkulturen (Raumtemperatur) direkt in 15° überführt und im Dauerlicht bzw. LDW gehalten. In diesem Fall konnte also noch keine adaptive Kältestabilisierung eingetreten sein. Die Zellvermehrung war auch hier bei intermediärer Verdunklung (LDW) deutlich stärker als im Dauerlicht. Während wiederum

die DNS-Zunahme der Zellvermehrung annähernd entsprach, wurde hier - im Unterschied zu Pseudochlorella bei hoher Temperatur - im LDW keine RNS-Zunahme beobachtet (Tabelle 4). Die Kontrolle dagegen zeigte sowohl eine Zunahme im Gesamt-N als auch in der RNS (vgl.die Versuche S. 18).

T a b e l l e 4

Chlorella 211/8K bei 15°. Vorkultur auf Agar bei Zimmertemperatur (23°), anschließend 72 Stunden bei 15° belichtet, danach verdunkelt. Kontrolle im Dauerlicht bei 15° in Klammern:

Versuchszeit nach Temperaturwechsel (fortlfd.)	Lichtregime	Zellzahl (rel.)	Gesamt-N (/ug/ml)	Nucleinsäuren (/ug/2 ml) DNS	RNS
72 Stunden	00 Dunkel	85(85)	12(12	.34(.34)	.2.8(2.8)
74 -	02 -	95	13	.36	2.75
80 -	08 -	120	14	.40	2.5
84 -	12 -	125(90)	15(13)	.42(.36)	2.3(4.2)
96 -	12 Licht	128(95)	16(14)	.45(.38)	2.6(4.5)

In einem zweiten Experiment (Tabelle 5) waren die Zellen im LDW 12:12 bei 25° vorsynchronisiert; sie wurden danach im Anschluß an 6 Stunden Belichtung 72 Stunden lang bei 15° weiter belichtet, um eine deutliche Teilungshemmung herbeizuführen. Diese Zellen sind dann relativ groß (plasmareich). Die nun verdunkelten Zellen teilen sich bei der niedrigen Temperatur kräftig und wesentlich ergiebiger, als es die infolge der eingetretenen Adaptation ebenfalls schwach teilungsfähigen Dauerlichtkontrollen zu tun vermögen. Der DNS-Vermehrung im LDW, die

wiederum etwa der Zellvermehrung entspricht, steht eine leichte Verminderung der RNS bei gering gefördertem Gesamt-N gegenüber. Dies entspricht der Beobachtung, daß die Zellgröße von den übernormalen Werten der gehemmten Zellenbei den Teilungen auf das normale Maß herabreguliert wird.

T a b e l l e 5

Chlorella 211/8K bei 15°. Versuch nach 6 Stunden Lichtzeit im Anschluß an 12/12 LDW (25°). Überführung in 15°. Verdunklung nach 72stündiger Belichtung in 15°. Kontrolle im Dauerlicht bei 15° in Klammern:

Versuchszeit nach Temperaturwechsel (fortlfd.)	Lichtregime	Zellzahl (rel.)	Gesamt-N. (γug/ml)	Nucleinsäuren (γug/2 ml) DNS	RNS
72 Stunden	00 Dunkel	115(115)	13(13)	.51(.51)	10.9(10.9)
80 -	08 -	300	28	.90	10.2
84 -	12 -	500(200)	32(24)	1.08(.83)	9.8(14.0)
96 -	12Licht	600(300)	86(50)	1.8(.98)	10.0(28.4)

Ein Vergleichsversuch mit Zellen, die nach Vorsynchronisation 36 Stunden lang vor der Verdunklung im Licht bei 15° gehalten waren, brachte ein ähnliches Ergebnis. Der LDW bewirkte im Zusammenhang mit der Teilung hier sogar eine geringe Abnahme der RNS (Tabelle 6). Wahrscheinlich hatten hier die gehemmten Zellen noch nicht soviel RNS produziert wie im vorangehenden Versuch,und die infolge DNS-Vermehrung ermöglichten Kern-und Zellteilungen erfolgten zu schnell, um die RNS aufholen zu lassen.

Tabelle 6

Chlorella 211/8K bei 15°. Versuch nach 6 Stunden Lichtzeit, anschließend an 12/12 LDW (25°), danach Überführung in 15°. Verdunklung nach 36-stündiger Belichtung in 15°. Kontrolle im Dauerlicht bei 15° in Klammern.

Versuchszeit nach Temperaturwechsel (fortlfd.)	Licht-regime	Zellzahl (rel.)	Gesamt-N (µg/ml)	Nucleinsäuren (µg/2 ml)	
				DNS	RNS
36 Stunden	00 Dunkel	50(50)	10(10)	.34(.34)	4.3(4.3)
40 -	04 -	65	11	.38	3.78
48 -	12 -	100(54)	13(12)	.48(.34)	3.6(4.7)
60 -	12 Licht	102(58)	14(12)	.49(.34)	4.3(5.2)
72 -	12 Dunkel	120(60)	15(12)	.55(.35)	4.0(5.6)

Insgesamt zeigt sich in den Versuchen dieses Abschnitts, daß die an der oberen und unteren Temperaturgrenze des Wachstums eintretende Teilungshemmung in starkem Maße von einer spezifischen Empfindlichkeit der DNS-Synthese bestimmt ist. Dabei ist neben der ungünstigen Temperatur noch eine zusätzliche Lichtwirkung im Spiele. Der Unterschied der Hemmung an der oberen und unteren Temperaturgrenze besteht vor allem darin, daß bei niedrigen Temperaturen die RNS-Vermehrung relativ wenig behindert ist und daher ein sehr hohes Verhältnis RNS/DNS erreicht werden kann, während bei hoher Temperatur die DNS-Hemmung von Abbauerscheinungen an der RNS begleitet ist.

Wird die zusätzliche Lichtwirkung durch Verdunklung ausgeschaltet, so werden je nach der Vorbehandlung der Zellen in stärkerem oder schwächerem Maße Zellteilungen ermöglicht. Allerdings wird auch durch Verdunklung die Teilungshemmung nicht soweit behoben, daß nun bei den "Grenztemperaturen" Teilungsraten erreicht werden, welche die beiden Stämme im Bereich ihrer Optimaltemperaturen aufweisen. Das Licht verstärkt also jeweils nur die temperaturbedingte Teilungshemmung.

6. Wachstumsfaktoren und Temperaturgrenzen

Es ist bereits bekannt, daß der Bedarf der Mikroorganismen an Wachstumsfaktoren oder spezifischen Substraten oft nicht durch absolute Zahlen gekennzeichnet werden kann, sondern mit den Kulturbedingungen variiert. Was den Temperaturfaktor betrifft, so tritt z. B. ein besonderer Wirkstoffbedarf (Hefeextrakt) gegenüber einem chemisch definierten Standardmedium bei einem Stamm von Saccharomyces cerevisiae auf, wenn von 30° auf 38° Anzuchttemperatur übergegangen wird (Begue und Lichstein 1959, Sherman 1959). Umgekehrt hat man bei Saccharomyces-Stämmen auch beobachtet, daß mit zunehmender Anzuchttemperatur die günstige Dosierung von Hefe-Extrakt im Medium niedriger wird (Sherman 1959). Nach Higuchi und Carlin (1958) ist bei Pasteurella pestis ein Wachstum bei 37° (gegenüber 27°) nur möglich, wenn D-xylose geboten wird. Weitere Effekte solcher Art sind schon von Campbell (1954) erwähnt worden.

An Algen haben Hutner u.Mitarb. (1957) entsprechende Erfahrungen gemacht, die sich unmittelbar auf den Bedarf an Vitamin B_{12} beziehen, das bekanntlich für Euglenen und andere Flagellaten einen unentbehrlichen Wachs-

tumsfaktor bildet. Bei Ochromonas malhamensis wurde festgestellt, daß bei Übergang zu höheren Anzuchttemperaturen (ab 34°) der B_{12}-Bedarf etwa auf das 300fache ansteigt. Algen mit stark autotropher Ernährungstendenz, wie besonders die meisten Chlorellen, gelten freilich bisher auch als generell "auxoautotroph", ohne daß dies jedoch bisher unter variierten Bedingungen kritisch geprüft worden wäre.

Es lag nun die Vermutung nahe, daß die von uns beobachtete Teilungshemmung von Chlorellen im Bereich niedriger und höherer Temperaturen, die durch Belichtung noch verstärkt werden, auf einer ungenügenden Produktion (oder einer Instabilität) von Wachstumsfaktoren von Vitamincharakter beruhen könnte. In diesem Falle sollten geeignete Zusätze den Temperaturbereich der Zellteilung bzw. DNS-Produktion nach oben bzw. unten erweiternund zudem, ebenso wie intermediäre Verdunklung, günstig auf die Zellvermehrung wirken können, so daß dann eine Dauerlichtkultur über einen größeren Temperaturbereich möglich wäre. Im folgenden Abschnitt wird an entsprechenden Versuchen demonstriert, daß sich diese Erwartung tatsächlich bestätigt. In Anlehnung an Hutner u.Mitarb. wurde zunächst die Wirkung von Vitamin B_{12} untersucht. Bei diesen Versuchen wurde für die beiden hier verwendeten Algenstämme die Teilungshemmung bei niedrigen und höheren Temperaturen nach den uns aus den vorangehenden Experimenten vorliegenden Erfahrungen induziert. Die jeweilige Vorbehandlung ist nicht erneut dargelegt, sondern in den Abbildungslegenden knapp wiedergegeben.

Ist die Teilung von Pseudochlorella bei 15° im Dauerlicht völlig stillgelegt, so kann ein Zusatz von Vitamin B_{12} diese Hemmung weitgehend aufheben.

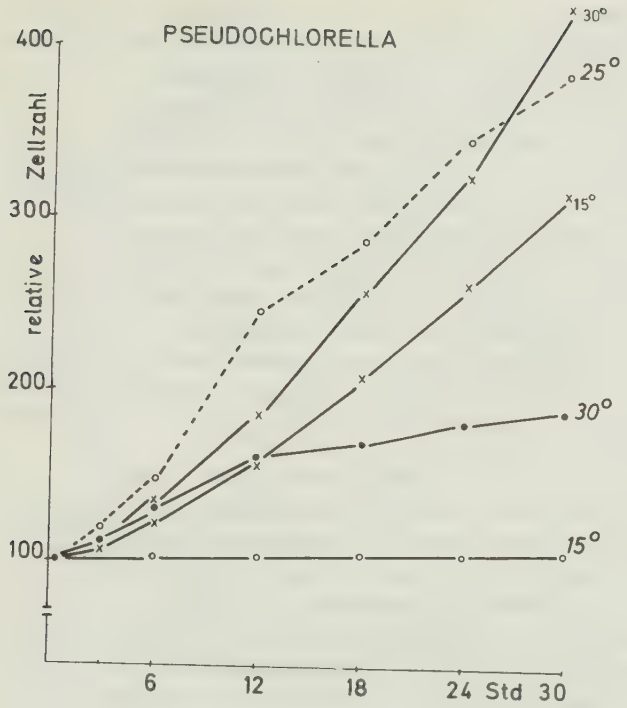

Abb.12 Einfluß eines Zusatzes von Vitamin B_{12}(X) auf die Zellvermehrung nach Übergang ins Dauerlicht (20 KLux). Kontrollen ohne Vitamin (O ●). Versuchstemperatur 15° und 30°; Vergleichsanzucht bei optimalem Wachstum (25°). Vorbehandlung: 3 Perioden LDW 12:12, dann 6 Stunden Licht bei 25°.

Die Zellen teilen sich in diesem Fall im Licht ohne Zwischenverdunklung mit etwa 3/4 der Rate von Zellen bei 25°, die sich ihrerseits ohne Zusätze optimal teilen. Ebenso kann eine bei 30° gehemmte Teilung durch Vitamingabe in Gang gebracht bzw. gehalten werden. Die Erweiterung des Temperaturbereichs der Zellteilung durch Vitamin B_{12} nach oben und unten kommt in Abb.12 deutlich zum Ausdruck. Bei der Beurteilung dieser Versuche ist zu beachten, daß das Vitamin hier von Beginn an wirkte, sich also infolge vorausgegangener Licht- und Temperaturhemmung keine sekundären Störungen ergeben haben konnten, wie dies bei einem Teil der Verdunklungsversuche in Abschnitt 5 möglich war.

Abb.13 faßt die Ergebnisse einer Versuchsserie zusammen, die mit Chlorella 211/8K durchgeführt wurden. Aus den früher dargelegten methodischen Gründen ist bei diesem Hochtemperaturstamm nur die Hemmung im Bereich niedriger Temperaturen (15°,25°) berücksichtigt. Die Zellen sind mit Vitamin B_{12} in der Lage, sich auch bei 15° im Dauerlicht zu teilen, freilich bei weitem nicht mit der Optimalrate dieses Stammes (30°). Sehr ausgeprägt ist der Vitamineffekt bei 25°, wo im Dauerlicht unter den gegebenen Bedingungen ohne B_{12}-Zusatz nur eine sehr geringe Teilung erfolgt. Man erhält hier nahezu die Zellzahlen, die die rein autotrophe Anzucht im Dauerlicht bei 30° erreicht. Ergänzend sei hier erwähnt, daß in anderen hier nicht dargestellten Versuchen die Vitamingabe bei 30° nahezu ohne Wirkung blieb, hier also der Vitaminspiegel die Zellvermehrung nicht begrenzt.

In Abb.14 ist weiterhin ein Versuch dargestellt, bei dem nicht die Zellzahlen, sondern die photo-

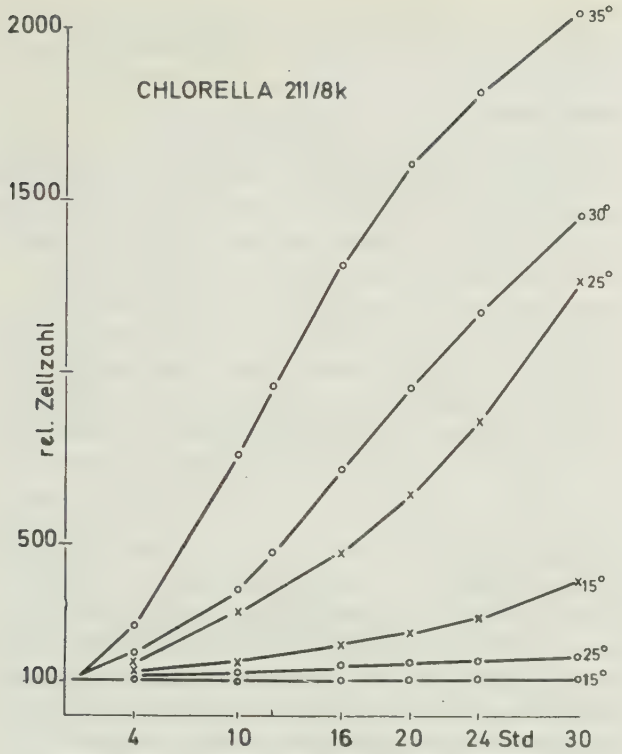

Abb.13 Einfluß eines Zusatzes von Vitamin B_{12}(X) auf die Zellvermehrung nach Übergang zu verschiedenen Temperaturen: 15,25,30,35°. Kontrollen ohne Vitamin (O). Vergleichsanzucht mit optimalem Wachstum (30°). Vorbehandlung: wie Abb.12

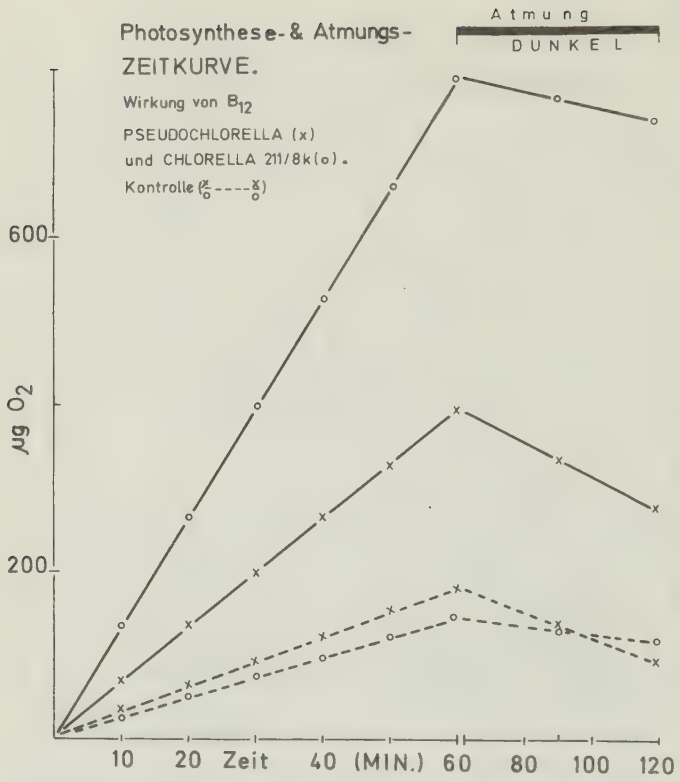

Abb.14 Photosynthetische Sauerstoffproduktion, bezogen auf 50 ml Zellsuspension (Dichte 1,5 x 10^6 Zellen/ml) bei 25° mit und ohne Zusatz von Vitamin B_{12} (50 µg/ml). Vorbehandlung: wie Abb.12. Wachstum 30 Stunden bei 20 KLux.

synthetische O_2-Produktion von Dauerlichtkulturen beider Algenstämme mit und ohne Zusatz von Vitamin B_{12} gemessen wurde. Der fördernde Effekt des Vitamins ist bei Chlorella 211/8K sehr deutlich, entsprechend der kombinierten Temperatur- und Lichthemmung bei 25° in der vitaminfreien Kontrolle. Weniger ausgeprägt ist der Unterschied bei Pseudochlorella, die ja auch bei 25° nicht teilungsgehemmt ist. Es ist immerhin bemerkenswert, daß dennoch die Photosynthese in der Kultur mit Vitamin gegenüber der Kontrolle etwa die doppelte Rate erreicht. Die nach der Belichtung gemessenen Werte der Dunkelatmung zeigen im wesentlichen die stammescharakteristischen Unterschiede in Versuch und Kontrolle; eine Vitaminwirkung auf die Atmung war nicht auszumachen.

Natürlich gestattet dieser Versuch keinen Schluß auf eine unmittelbare Beziehung zwischen Vitamin B_{12} und der Photosynthese. Ein solcher direkter Effekt wird auch dadurch unwahrscheinlich, daß Zusatz von Vitamin zu bereits gehemmten Zellen die Photosynthese nicht kurzfristig zu steigern vermag. Wahrscheinlich ist die höhere Photosyntheseleistung ein sekundärer Effekt und als solcher Ausdruck eines günstigeren Allgemeinzustandes des Zellmaterials nach Vitamingabe.

Abb.15 soll das cytologische Bild der Zellen von Chlorella 211/8K in vitaminfreier und vitaminhaltiger Nährlösung bei Dauerbelichtung wiedergeben. Sowohl bei 15° als auch bei 25° resultieren im Licht ohne Vitamin innerhalb von 30-50 Stunden Riesenzellen. Bei 25° sind sie mehrkernig, bei 15° enthalten sie jedoch nach Aussage der Feulgenreaktion größere, aber ungeteilte Kerne. Ist Vitamin B_{12} anwesend, so teilen sich bei 15° die Zellen im Licht langsam und bleiben dabei relativ groß; bei 25° ist die

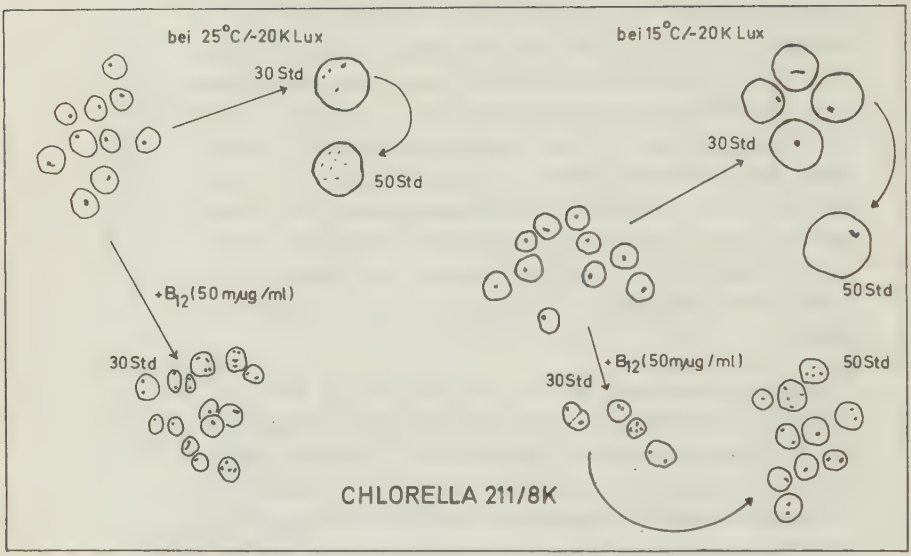

Abb.15 Einfluß von Vitamin B_{12} auf Kern- und Zellteilungen von Chlorella 211/8K. Vor Vitamingabe Anzucht im LDW 12:12 bei 25°.

Teilungsrate höher und die Zellgröße entsprechend geringer. In beiden Temperaturen findet man mit Vitamin mehrkernige Stadien, die jedoch dem normalen Entwicklungszyklus angehören dürften. Die mikroskopischen Beobachtungen an Pseudochlorella ergaben etwa gleiche Bilder; jedoch traten hier größere Unregelmäßigkeiten auf, möglicherweise deshalb, weil die Tendenz zur Synchronisierung im LDW 12:12 bei diesem Stamm gering ist.

Im Hinblick darauf, daß die temperatur- und lichtbedingten Hemmungserscheinungen offensichtlich mit einer Hemmung der DNS-Produktion in engerem Zusammenhang stehen, kann man vermuten, daß Vitamin B_{12} seine enthemmende Wirkung über den DNS-Umsatz nimmt. Es wurde daher versucht, Bausteine der DNS daraufhin zu prüfen, ob sie das Vitamin B_{12} in seiner Wirkung ersetzen können. Dabei wurden mit Desoxy-Thymidin einige eindeutige Ergebnisse erhalten.

Desoxythymidin hat - offenbar als eines der Substrate der DNS-Synthese - auf Pseudochlorella im Dauerlicht bei 15° eine ganz ähnliche Wirkung wie Vitamin B_{12} (Abb.16). Daß dies Nucleosid als Substrat die Wirkung von Vitamin B_{12} erst bei etwa 1000facher Dosierung erreicht, entspricht durchaus der Erwartung. Auch bei Chlorella 211/8K erhält man entsprechende Werte; hier ist allerdings die überhaupt erreichbare Zellvermehrung bei 15° relativ gering, entsprechend der genetischen Anpassung des Stammes an höhere Temperaturbereiche. Entsprechend zeigt Abb.17, daß Chlorella 211/8K bei Lichthemmung in 25° eine sehr ausgeprägte Reaktion auf das Thymidin zeigt, ebenso wie Pseudochlorella im Vergleichsversuch bei 15°.

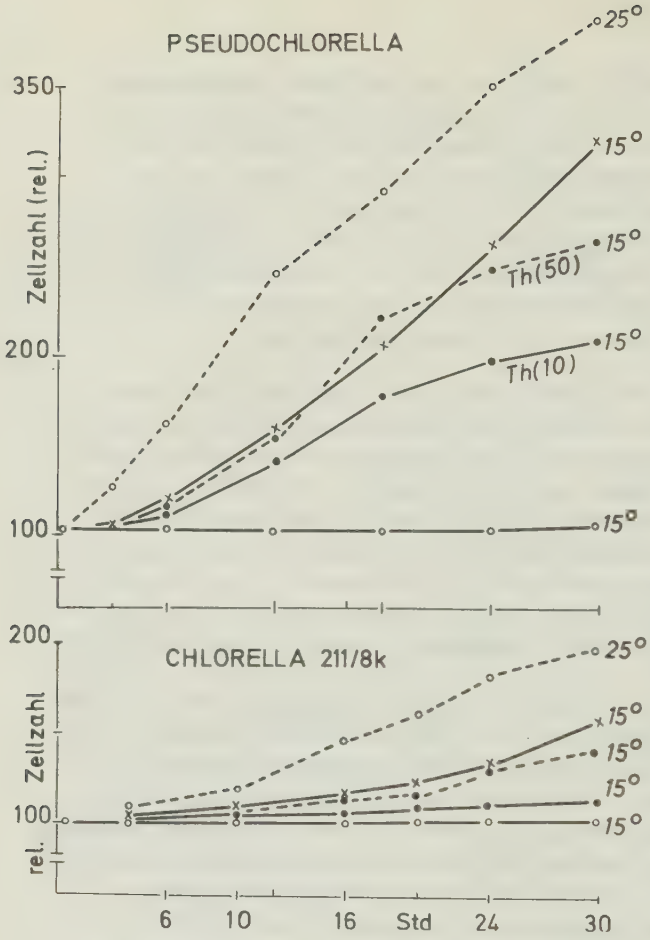

Abb.16 Wirkung von Desoxythymidin (●) und Vitamin B_{12}(X) auf die Zellteilung im Dauerlicht bei Pseudochlorella und Chlorella 211/8K bei 15°. Vergleichsversuch mit 25° ohne Zusätze (o- - -o), Kontrolle bei 15° ohne Zusätze (o———o).

Thymidin Konzentrationen 10 und 50 µg/ml
Vitamin B_{12} .. .. .. 50 µg/ml

Vorbehandlung: wie Abb.12

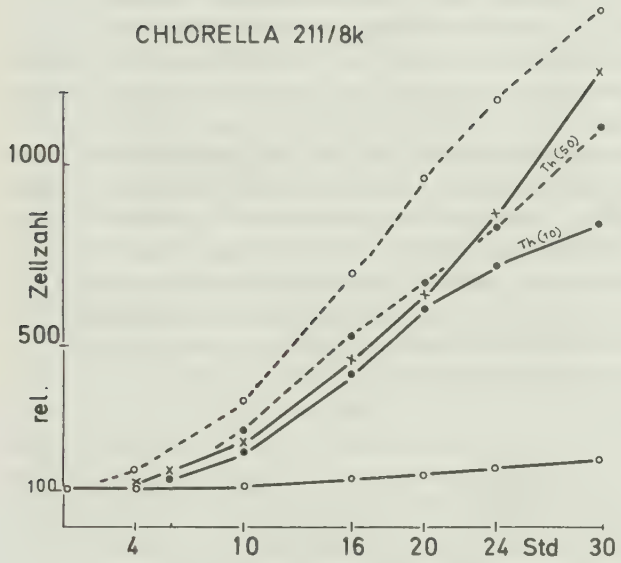

Abb.17 Wirkung von Desoxythymidin (●) und Vitamin B_{12}(X) auf die Zellteilung von Chlorella 211/8K im Dauerlicht bei 25°.

Vitamin B_{12} .. 50 µg/ml

Thymidin .. .. 10 und 50 µg/ml

Vorbehandlung: wie Abb.12

Andere Versuche mit DNS-Bausteinen verliefen weniger überzeugend und waren außerdem dadurch behindert, daß die erforderlichen Nucleoside der Ribose- und der Desoxyribose-Reihe zum Vergleich nicht sämtlich verfügbar waren. Ribose und Desoxyribose als freie Zucker gegeben, hatten in einem Experiment zwar verschiedene Wirkung (Ribose negativ, Desoxyribose positiv); auch wirkte dabei B_{12}+ Ribose ähnlich wie Desoxyribose. Doch ließen sich die Befunde nicht regelmäßig reproduzieren. Versuche mit anderen Nucleosiden - soweit vorhanden - verliefen unterschiedlich, möglicherweise weil die Voraussetzungen für die Aufnahme dieser Verbindungen in die Zelle nicht in jedem Fall und in gleichem Maße gegeben sind. Erwähnenswert und auffällig war, daß Ribose-Cytosin einen recht ausgeprägt enthemmenden Einfluß ausübte. Weitere planmäßige Versuche in dieser Richtung sind notwendig und erscheinen aussichtsreich, sofern sie nicht durch Permeationsschwierigkeiten begrenzt sind.

Diskussion

Wir betrachten zunächst die Photosynthese bei Lichtsättigung in ihrer Abhängigkeit von der Temperatur während der vorausgehenden Anzucht. Die relativ kurze Dauer der Temperatureinwirkung schließt eine Mutantenselektion als Ursache der beobachteten Variabilität sicher aus. Für die beiden Algenstämme ergibt sich also eine ausgeprägte modifikative Adaptation; ihr Ausmaß wird besonders deutlich, wenn die Photosynthesemessung ihrerseits bei verschiedenen Temperaturen vorgenommen wird. Beide Stämme reagieren in recht verschiedener Weise, die einer genetisch bestimmten Einstellung auf verschiedene Temperaturbereiche entspricht. Die "Reaktionsnorm" des Photosyntheseapparats

auf Temperatureinflüsse besitzt zwar eine sehr weite Amplitude; innerhalb dieser bleiben jedoch die genetisch gezogenen Grenzen klar erkennbar. Als "Niedertemperatur"-Stamm erreicht Pseudochlorella bei niedriger Anzuchttemperatur und niedriger Messtemperatur (15°/15°) die für sie charakteristische Höchstleistung; man kann sie andererseits durch relativ hohe Temperaturen in der Vorkultur (30°) bei höheren Messtemperaturen (30-35°) noch zu Photosyntheseleistungen bringen, zu denen sie bei niedrigen und mittleren Temperaturen der Anzucht nicht fähig wäre. Der "Hochtemperaturstamm" wird nach 30 und 35° Voranzucht seinem Namen weit mehr gerecht, als nach Vorkultur bei 15°. Diese bewirkt ihrerseits keine deutliche Anpassung an niedrige Temperaturen, dagegen eine starke Depression der Photosyntheseleistung im Bereich der höheren Temperaturen. Während also die niedrigen und (in geringem Maß) die hohen Anzuchttemperaturen bei Pseudochlorella eine "positive" Adaptation des Photosyntheseapparates auslösen, ist beim Hochtemperaturstamm eine solche positive Wirkung auf die höheren Anzuchttemperaturen beschränkt. Wenn auch einzuräumen ist, daß die ausgewählten Stämme ökologisch-physiologische Extreme darstellen, so ist doch auch für sog.Normalstämme von Chlorella mit ähnlich gerichteten Einflüssen der Voranzucht-Temperatur zu rechnen. Die Erfahrungen dieser Arbeit machen es jedenfalls sehr zweifelhaft, ob eine selbst unter wohldefinierten Anzuchtbedingungen einzeln ermittelte "Maximalleistung" der Photosynthese als Stammeskennzeichen Verbindlichkeit besitzt. Es muß ferner darauf hingewiesen werden, daß die Photosyntheseleistung - gerade bei Lichtsättigung - in starkem Maße auch von der Belichtungsdauer, d.h. zugleich von der Dauer der Photosynthese-

messung selbst bestimmt sein kann. Beispiele hierfür hat Sorokin (1960) gerade für den von uns benutzten "Hochtemperaturstamm" gegeben. Die zellphysiologischen Grundlagen der Temperaturanpassung, die unter unseren Versuchsbedingungen wohl stets mit einer mehr oder weniger starken Protein-Neusynthese verknüpft ist, sind vorläufig noch unerforscht. Gross und Jahn (1962) diskutieren zwar die Möglichkeit, daß bei solchen Adaptationen die Bildung thermolabiler (bzw. entsprechender thermostabiler) Proteine erfolge; doch ist bisher nicht bekannt, wieweit etwa Photosyntheseenzyme mit verschiedenen Temperaturcharakteristiken überhaupt in Betracht kommen. Die Suche danach wäre - gerade in extremeren Adaptationsfällen - eine interessante Aufgabe.

Die ohne komplizierte Registriereinrichtungen nur kurzfristig, d.h. stichprobenartig erfaßbare Photosynthese gibt keinen sicheren Anhaltspunkt für die Beurteilung der Gsamtbilanz in den wachsenden autotrophen Zellen. Legt man der Beurteilung von Adaptationserscheinungen die Zellteilung in Dauerlichtkulturen zugrunde, so erhält man ebenfalls eine von genetischen Stammesverschiedenheiten geprägte Variabilität, die sich jedoch in engerem Rahmen hält. Dies gilt besonders für die untere Temperaturgrenze der Teilung, die sich bei unseren beiden Stämmen nur um etwa 5° unterscheidet und durch Vorkultur auch nur um etwa $5\text{-}10^{\circ}$ verschoben werden kann. Diese untere Grenze (10 bzw. 15°) ist bestimmt durch die Blockierung von DNS-Vermehrung und Mitose, während RNS und Protein, u.U. auf Kosten von Kohlenhydratreserven, weitergebildet werden. An der oberen Temperaturgrenze der Zellteilung ist zwar oft noch eine Mitose ohne Zellteilung nachweisbar, die DNS-Zunahme aber auch hier nur gering. Mit zunehmender Dauer der Hemmung

treten dann offenbar zunächst noch reversible Abbauvorgänge ein, die an einem RNS-Schwund erkannt werden. Dieser kann bei Aufhebung der Hemmung (siehe unten) durch intensive RNS-Synthese überkompensiert werden. Die Annahme liegt nahe, daß die RNS, die in solchen Übergangszuständen gefunden wird, zum Teil den Charakter von Reservematerial hat. Unsere Befunde lassen sehr deutlich eine hohe selektive Empfindlichkeit der DNS-Synthese auch bei Übergang zu niedrigen und hohen Temperaturen erkennen. Der relativ enge Temperaturbereich der DNS-Synthese begrenzt also die Zellvermehrung offenbar nach beiden Richtungen.

Ein Urteil über die Temperaturgrenzen von Photosynthese, Wachstum und Zellvermehrung und damit auch der Adaptationsmöglichkeiten wäre ganz unvollkommen ohne Berücksichtigung der erst in den letzten Jahren in Einzelheiten belegten Erkenntnis, daß das Licht keineswegs nur den Photosyntheseapparat in Betrieb setzt. So kann sichtbares Licht unter bestimmten Voraussetzungen schon bei mäßiger Beleuchtungsstärke einen markanten Hemmeffekt auf die Zellteilung ausüben. Daß hierbei eine höhere Anzuchttemperatur besonders stark mitwirkt, weiß man schon seit längerem (Gross u.Jahn (1962) für Euglena und Chlamydomonas, Sorokin und Krauss (1958,1965) und Lorenzen (1963) für Chlorella-Stämme). Auch bei weniger extremen Temperaturen sind entsprechende Hemmeffekte bekannt geworden. Der kurzwellige Anteil der sichtbaren Strahlung und das Zellalter spielen beim Zustandekommen der Lichthemmung eine wesentliche Rolle (Pirson u.Ruppel 1962, Kowallik 1962). Daß der Photosyntheseapparat (Chlorophyll) hieran nicht direkt beteiligt ist, ergibt sich besonders aus der (Blau)-Lichthemmung nichtgrüner Einzeller (Kowallik(1965)für Prototheca, Matile (1962) und

Ehrenberg (1966) für Hefe, Schön und Engel (1962) für Bacterien). Unsere Beobachtungen unterstreichen die schon von Lorenzen (1963) erwähnte Tatsache, daß eine entsprechende Lichthemmung auch im Bereich tiefer Temperaturen in den Vordergrund treten kann und dann sogar für die untere Temperaturgrenze der Zellvermehrung verantwortlich ist. Verdunklung hebt, sofern rechtzeitig vorgenommen, die Hemmung an der oberen und unteren Temperaturgrenze auf. Damit läßt sich, wie auch in vorliegender Arbeit gezeigt, der Temperaturbereich der Teilungen durch Licht/Dunkel-Wechsel ganz wesentlich erweitern. Es kann geschlossen werden, daß unter natürlichen Lichtverhältnissen ebenso wie bei den experimentell gebotenen Licht-Dunkel-Wechseln die Lichthemmung der Teilung keine wesentliche Rolle spielt. So mag es zu erklären sein, daß sich unser Pseudochlorella-Stamm in seinem ursprünglichen Biotop, dem Flechtenthallus, in kaltem Klima langsam vermehren kann und zur Photosynthese noch bei sehr niedrigen Temperaturen (-11°) befähigt ist (Lange (1962), Lange und Metzner (1965)); im Dauerlicht würde hier bei weitem keine positive C-Bilanz mehr erzielt werden können. Der echte Temperaturbereich der Stämme, d.h. ihre volle Adaptationsamplitude ist somit nur bei geeignetem ($\pm$ natürlichem) Lichtregime zu erfassen.

Einen Weg zum besseren Verständnis der Teilungshemmung durch Licht kann unsere Beobachtung eröffnen, daß Zusatz von Vitamin B_{12} gleichermaßen wie richtig applizierte Dunkelzeiten den bestehenden Block beseitigt und so ebenfalls den Temperaturbereich der Zellteilung - nun im Dauerlicht - nach oben und unten erweitert. Wahrscheinlich hat bei den Befunden von Hutner und Mitarb.(1957) an Ochromonas - die Vermehrung des Bedarfs an Vitamin B_{12} bei höheren Temperaturen -

ebenfalls die Aufhebung einer Lichthemmung mitgespielt. Es erhebt sich sogleich die Frage, welcher biochemische Defekt es ist, der bei höheren und niederen Temperaturen durch Licht ausgelöst oder wenigstens verstärkt wird und durch Vitamin B_{12} behoben werden kann. Unsere Versuche, diese Analyse einzuleiten, sind zunächst noch recht unvollkommen. Sehr wahrscheinlich bildet die DNS-Synthese hier einen der maßgebenden Schritte. Dafür spricht die gleichartige Wirkung von Vitamin B_{12} und Desoxythymidin als enthemmende Agentien im Dauerlicht. Eine biochemische Deutung dieses gleichsinnigen Effekts, bei dem der Bedarf an Thymidin den an Vitamin etwa um das Tausendfache übertrifft, könnte man darin sehen, daß Vitamin B_{12} die Reduktion von Ribonucleotiden zu Desoxyribonucleotiden vermittelt. Biochemische Belege für die Funktion des Vitamin B_{12} in einer Ribonucleotid-Reduktase sind u.a. von Blakley (1965) beigebracht worden. Daß gerade dieser Schritt im Dauerlicht und in extremeren Temperaturbereichen den kritischen Engpaß bildet, ist freilich angesichts zahlreicher anderer Wirkungsmöglichkeiten des Vitamin B_{12} noch durchaus hypothetisch. Zur Bekräftigung dieser Auffassung bzw. zur Erlangung anderer Hinweise müßte eine weit größere Zahl von Zwischenprodukten des Nucleinsäurestoffwechsels auf eine enthemmende Wirkung hin getestet werden.

Zusammenfassung

1. Die Variabilität der photosynthetischen Sauerstoffausscheidung (Sättigungswert bei 20 KLux) von zwei Algenstämmen des Chlorellatyps mit genetisch unterschiedlicher Temperatureinstellung wurde in Abhängigkeit von der Temperatur während der Anzucht untersucht. Die modifikative Anpassungsfähigkeit ist beträchtlich, bleibt jedoch genetisch bestimmt vom

"Hochtemperatur"- und "Niedertemperatur"-Charakter der Algen.

2. Die Zellteilung in Dauerlichtkulturen beider Algen unterliegt bei mäßiger Anpassungsfähigkeit an die Anzuchttemperatur ebenfalls den genetisch bedingten Stammesverschiedenheiten. Sie ist jeweils begrenzt durch den relativ engen Temperaturbereich der DNS-Synthese.

3. Durch analytische Daten zur Zellzusammensetzung wird der Zustand der Algen im Dauerlicht oberhalb und unterhalb des Temperaturbereichs der Zellteilung und nach Umsetzversuchen (Temperatursprüngen) gekennzeichnet.

4. Der Temperaturbereich der Zellteilung wird durch kontinuierliche Beleuchtung stark eingeengt. Die lichtabhängige Teilungshemmung kann durch Verdunkeln (Licht/Dunkel-Wechsel) aufgehoben werden. Die Anpassungsfähigkeit an höhere und niedere Temperaturen ist daher stark vom Lichtfaktor mitbestimmt.

5. Vitamin B_{12} (50/ug/liter) ermöglicht im Dauerlicht eine etwa optimale Zellteilung in Temperaturen, bei denen ohne Vitaminzusatz die Teilung blockiert ist.

6. Vitamin B_{12} kann in seiner der enthemmenden Wirkung auf die Zellteilung im Dauerlicht durch Desoxythymidin in 10^3facher Dosierung ersetzt werden. Die Zellvermehrung wird durch Vitamin B_{12} und Thymidin in Gang gebracht.

7. Mit einer Auxoheterotrophie unter extremeren Kulturbedingungen (Dauerlicht, höhere oder niedrige Anzuchttemperaturen) muß auch bei Algen gerechnet werden, deren Photoautotrophie unter "normalen" Verhältnissen komplett erscheint.

Literaturverzeichnis

Begue, W.J. and Lichstein, H.C. (1959): Bact.Proc.(Soc.Amer.Bacteriologists),II3.

Blakley, R.L.(1965): J.Biol.Chem.,240,2173-2180.- Cobamides and Ribonucleotide Reduction. I. Cobamide stimulation of Ribonucleotide Reduction in Extracts of Lactobacillus leichmanii.

Campbell,L.L.(1954): J.Bacteriol.,68, 505-507.

Ehrenberg,M.(1966) : Archiv f.Mikrobiol.,54,358-373. - Wirkungen sichtbaren Lichtes auf Saccharomyces cerevisiae. I. Einfluß verschiedener Faktoren auf die Höhe des Lichteffectes bei Wachstum und Stoffwechsel.

Gross,J.A.,and Jahn,T.L.(1962): J.Protozool.,9,340-346. - Cellular Responses to Thermal and Photo Stress. I. Euglena and Chlamydomonas.

Higuchi, K. and Carlin,C.E.(1958): J.Bacteriol.,75,409-413

Hutner,S.H.et al.(1957): J.Protozool.,4,259-269. - Growing Ochromonas malhamensis above 35°C.

Iwamura,T.(1955): J.Biochem.(Tokyo),42,575-589. - Changes of nucleic acid content in Chlorella cells during the course of their life-cycle.

Johnson,B.F.and James,T.W.(1960): Expt.Cell Res.,20, 66-70. - Alteration of cellular constituents by incubation temperature.

Kellner,K.(1955): Biol.Zentralblatt, 74, 662-691. - Die Adaptation von Aktistrodesmus braunii an Rubidium und Kupfer.

Kessler,E. und Czygan,F.-C. (1966): Ber.dtsch.Bot. Ges.,78/8,342-347.- Chlorella zofingiensis.
Dönz: Isolierung neuer Stämme und ihre physiologisch-biochemischen Eigenschaften.

Kuhl,A. und Lorenzen,H.(1964): In Prescott, M.D.edt.- Methods in Cell Physiology I, 159-187.- Handling and Culturing of Chlorella.

Kowallik,W.(1962):Planta,58, 337-365.- Über die Wirkung des Blauen und Roten Spektralbereichs auf die Zusammensetzung und Zellteilung synchronisierter Chlorella.

_____(1965):Flora,156, 231-235.- Wachstumshemmung von Prototheca im Licht.

Lange, O.L.(1962):Ber.dtsch.bot.Ges.,75/9,351-352.- Die Photosynthese der Flechten bei tiefen Temperaturen und nach Frostperioden.

_____(1965):Planta,64, 1-9.- Der CO_2-Gaswechsel von Flechten bei tiefen Temperaturen.

_____und Metzner,H.(1965):Naturwiss.,52,8,191.- Lichtabhängiger Kohlenstoff-Einbau in Flechten bei tiefen Temperaturen.

Lorenzen,H.(1959):Flora,147,382-404.- Die photosynthetische Sauerstoffproduktion wachsender Chlorella bei langfristig intermettierender Belichtung.

Lorenzen,H.(1963): Flora, 152, 554-592.- Temperatureinflüsse auf Chlorella pyrenoidosa unter besonderer Berücksichtigung der Zellentwicklung. - Temperaturwirkungen an oberen und unteren Toleranzgrenzen.

_____und Ruppel,H.G.(1960): Planta, 54,394-403.- Versuche zur Gliederung des Entwicklungsverlaufs der Chlorellazelle.

Lund,J.W.G.(1955): Österr.Bot.Zeitschr.,102,104. - Pseudochlorella nov. nom.

Matile,Ph.(1962): Ber.Schweiz.botan.Ges.,72,236-261.- Wirkungen des sichtbaren Lichtes auf Atmung der Hefe.

Mazia, D.(1961): In Brachet,J.and Mirsky,A.E. edt.- The Cell. Acad.Press, New York and London. - Mitosis and the physiology of cell division. II4f.

Pirson,A. und Ruppel,H.G.(1962): Arch. Mikrobiol.,42, 229-309.- Über die Induktion einer Teilungshemmung in synchronen Kulturen von Chlorella.

_____,Lorenzen,H.und Ruppel,H.G.(1963): Microalgae & Photosynth. Bact.,127-139. (Plant Cell Physiol.,Tokyo). - Der Licht-Dunkel-Wechsel als synchronisierendes Prinzip.

_____and Kowallik,W.(1964): Photochem.Photobiol., 3.489-497. - Spectral responses to light by unicellular plants.

Roe, J.H.(1955): J.Biol.Chem.212, 335-343. - The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent.

Ruppel,H.G.(1962):Flora,152,113-138. - Untersuchungen über die Zusammensetzung von Chlorella bei Synchronisation im Licht-Dunkel-Wechsel.

Schön, W.J.(1955): Flora, 142, 347-380. - Periodische Schwankungen der Photosynthese und Atmung bei Hydrodictyon.

_____und Engel,H.(1962): Arch.Mikrobiol.,42,415-428.- Der Einfluß des Lichtes auf Nitrosomonas europaea Win.

Sherman, F.(1959): J.Cell.Comp.Physiol.,54,29-35.

Shihira,I. and Krauss,R.W.(1963): Chlorella-Physiology and Taxonomy of forty-one Isolates, Port City Press, Baltimore.

Simonis,W.(1960): In Handb.der Pflanzenphysiol.,5/2, 269-303. - Experimental erzeugte Anpassungen.

Sorokin, C.(1959):Biochem.et Biophys. Acta, 38, 197-204.- Kinetic studies of temperature effects on the cellular level.

_____ (1960):Physiol.Plant.,13,20-35. - Injury and recovery of photosynthesis. - The capacity of cells of different developmental stages to regenerate their photosynthetic activity.

_____and Krauss,R.W.(1965): Amer.J.Bot.,52/4,331-339. - The dependence of cell division in Chlorella on temperature and light intensity.

Tödt, F. (1958): Konzentrationsmessungen oxydierender und reduzierender Stoffe durch galvanische Modellelemente. In Elektrochemische Sauerstoffmessungen, Berlin.

Wolf, G.(1964): Diss.-Arbeit, Universität Göttingen.- Die Atmung von Chlorella im Verlauf der Zellentwicklung.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. André Pirson, danke ich für die Anregung dieser Arbeit und für seine stete, ermutigende Anteilnahme an ihrem Fortgang.

Fräulein Marga E. Schmitz sei an dieser Stelle für die Verlängerung des Termins von D A A D für Stipendiumbeihilfe gedankt.

Lebenslauf

Am 1. Juli 1932 wurde ich als Sohn des Stadtregierungs-beamten N.B.Das und seiner Ehefrau Indurekha Devi geb. Kalkutta, in Bhairabbazar(Bengalen, Indien) geboren. In Bankura(Westbengalen) besuchte ich die Bankura Zilla Schule an der ich 1947 die Abschlußprüfung (Matriculation Examination,-First Division) ablegte. Nach einem 2-jähriger Studium der Fächer: Chemie, Physik, Mathematik, Botanik English und Bengalisch an Bankura Christian College (I.Sc., 1949,-First Division) begann ich 1949 am Presidency College, Kalkutta Universität zu studiemn. Im Jahr 1952 legte ich die Diplomprüfung B.Sc(Hons.) in Botanik, Chemie und Physik ab. 1954 bestand ich die Abschlußpuüfung der Kalkutta Universität als M.Sc. (First Class).
Bis 1957 besuchte ich das State Agricultural Research Institut und das Bose Research Institut in Kalkutta; bis 1962 war ich in der Botanical Survey of India, Kalkutta beschäftig. Meine akademischen Lehrer in Indien sind in den Hauptfächern: Prof. Dr J.C.SenGupta, Prof. Dr S.M. Sircar F.N.I. und Prof. Dr. J.K.Choudhuri.
Im Sommersemester 1963 setzte ich mein Studium in Göttinger fort, wo ich meine Doktorarbeit bei Professor Dr A.Pirson im Pflanzenphysiologischen Institut d. Universität Göttingen begann. Meine Lehrer in Mikrobiology sind Prof. Schlegel, Prof Brockmann in Organischer Chemie und Prof Dr A. Trebst in Biochemie.

BAMBERGER FOTODRUCK - Rudolf Rodenbusch